

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

POUR L'OBTENTION

DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DOCTORAT D'UNIVERSITÉ)

PAR

MICHEL BONNEAU

Pharmacien

Lauréat de la Faculté

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

LE DOSAGE DE L'OXYDE DE CARBONE DANS LE SANG

Comparaison des Techniques Classiques
avec une Méthode microphotométrique

Soutenue le Novembre 1951 devant la Commission d'Examen

MM. R. FABRE, Président
M. GUILLOT, Professeur
R. TRUHAUT, Maître de Conférences





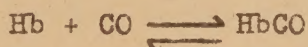
I N T R O D U C T I O N

GREHANT [37] en 1872, après les premières études toxicologiques sur l'Oxyde de Carbone, concluait à "l'élimination en nature de ce gaz par les voies respiratoires, accélérée par les inhalations d'oxygène". Il devait susciter un nombre considérable de recherches qui prirent corps par la suite, tant sur le mécanisme d'action de CO, sur les moyens de le détecter dans l'atmosphère, de le doser dans l'air, dans le sang du sujet intoxiqué, que sur les moyens de prévention et de traitement.

Peu après, Claude BERNARD [8] dans sa "Leçon sur l'Asphyxie" (1875) confirmait la pensée de Gréhan. Il démontrait en outre la fixation de CO sur l'hémoglobine sanguine, croyant alors à la formation d'une combinaison stable entre CO et l'Hémoglobine.

HALDANE [42], en France (1895), MOSSO [64], en Italie (1901), apportèrent bientôt de nouvelles lumières par leurs expériences : en augmentant la pression de l'oxygène dans l'air inspiré, ils augmentaient la quantité d'oxygène dissoute dans le sang, et obtenaient ainsi la survie d'animaux contraints à respirer une atmosphère très riche en Oxyde de Carbone.

Mais c'est NICLOUX [68] (1925) qui comprit le premier le mécanisme de l'asphyxie : il démontra la réversibilité de la réaction



étudia les propriétés physiologiques de ce gaz et orienta surtout ses recherches vers les moyens de déceler et doser CO dans l'air, et le sang du sujet intoxiqué.

Sa méthode d'extraction des gaz du sang et de dosage chimique de CO, mise au point à cette époque et perfectionnée depuis, est encore l'une des plus pratiquées à l'heure actuelle.

A la suite de Nicloux de nombreux auteurs tirèrent profit des propriétés physiques, chimiques et biologiques de CO, et mirent au point des techniques variées de dosage de ce gaz dans le sang, comprenant tout l'intérêt que ce moyen d'investigation offrait dans le diagnostic de l'intoxication et dans la marche du traitement à suivre.

C'est ainsi que BALTHAZARD [2], en 1924, utilisant les notions maintenant classiques, des différences essentielles entre les spectres d'absorption de l'hémoglobine réduite, de l'Oxyhémoglobine et de la Carboxyhémoglobine, établit une méthode de détermination spectrophotométrique de HbCO, séduisante par son élégance et sa rapidité, mais malheureusement impraticable dans le cas de teneurs en HbCO dans le sang inférieures à 12 à 15 %.

Il est vrai qu'à cette époque "l'Intoxication oxycarbonique aigue" surtout retenait l'attention des chercheurs : incendies, coups de grisou, fuites de conduites de gaz d'éclairage, becs à incandescence, explosions importantes, etc...

Mais avec le développement de l'hygiène industrielle, et aussi l'usage de plus en plus répandu des moteurs à explosion etc... on s'est intéressé à une autre forme d'oxycarbonisme : "l'Intoxication Chronique", très différente de l'Intoxication aiguë par la symptomatologie et les effets durables.

Le diagnostic de cette intoxication chronique est difficile, car les symptômes sont purement subjectifs, et il faut déceler dans le sang des faibles teneurs en CO, allant de Occ.40 à Occ.50 à 5 cc. %.

De plus, cette intoxication touche la plupart du temps des collectivités, telles le personnel d'une usine, une école entière, etc... et pose de ce fait le problème d'une méthode rapide de dosages en série.

Les techniques chimiques les plus précises jusqu'à ce jour sont pour la plupart conditionnées par l'extraction des gaz, opération qui demande plusieurs heures et un appareillage complet pour chaque échantillon. De plus la prise d'essai de sang doit être importante.

Les conditions de vie défectueuses causées par la guerre, de 1940 à 1945, donnèrent encore plus d'acuité au problème de l'Oxycarbonisme chronique. En effet, l'usage très répandu à l'époque des véhicules à gazogène, le grand nombre des installations précaires de chauffage, augmentèrent le pourcentage des "intoxiqués chroniques".

Malgré les moyens modernes de protection contre CO, malgré l'emploi des détecteurs d'alerte dans les usines, malgré les systèmes d'aération et de ventilation, on constate que le nombre des intoxications même aiguës est encore très élevé aujourd'hui.

Il suffit pour s'en convaincre de se reporter à un tableau de statistiques très récentes établi par PIERRET [81], et paru en août 1949, dont nous reproduisons ci-dessous les indications principales, pour comprendre l'importance de ce problème :

Aux Etats-Unis, environ 5.000 intoxications mortelles par an

En Allemagne, " 4.400 " " " "

En France (intoxications aiguës)

Année	1944.....	2.970	"	"	"	"
	1945.....	2.991	"	"	"	"
	1946.....	2.116	"	"	"	"
	1947.....	1.989	"	"	"	"
	1948.....	1.680	"	"	"	"

Il nous a semblé qu'une méthode de dosage de CO dans le sang, permettant des déterminations rapides, en série, et tout de même assez précises pour déceler des faibles quantités de CO génératrices des cas chroniques, serait d'une grande utilité.

Reprenant les données des propriétés spectrographiques des combinaisons oxygénées et oxycarbonées sanguines, nous avons pensé améliorer la méthode de Balthazard. Et nous avons cherché si une technique spectrographique combinée avec un enregistrement au microphotomètre permettrait d'augmenter la précision de la méthode, et de déterminer les faibles teneurs en CO du sang malade

Dans l'exposé de ce travail, nous indiquerons d'abord succinctement les propriétés physiques, chimiques et biologiques de l'Oxyde de Carbone qui furent utilisées pour mettre au point les principales techniques de dosage de CO dans le sang.

Nous passerons en revue, ensuite, les principales méthodes de dosage chimiques, gazométriques, photométriques, spectrométriques etc... utilisées jusqu'à ce jour, et ferons leur étude critique.

Nous proposerons enfin notre méthode, nous décrirons les étapes qui nous ont conduit à notre technique, nous confronterons les résultats obtenus avec ceux des autres méthodes.

Enfin dans une dernière partie, nous exposerons les recherches que nous avons amorcées en collaboration avec A. Berton, sur la spectrographie Infra-Rouge des composés de l'hémoglobine.

Nous donnons ci-dessous le plan de cet exposé :

Première Partie : Propriétés physiques, chimiques, biologiques et physiologiques de CO.

Deuxième Partie : Principales Méthodes de dosage de CO dans le sang. Leur étude critique.

Troisième Partie: Proposition de notre méthode.

Quatrième Partie: Remarques sur le spectre Infra-Rouge de la Carboxy-hémoglobine.

PREMIERE PARTIE

PROPRIETES DE L'OXYDE DE CARBONE

L'oxyde de carbone, gaz extrêmement répandu, et d'autant plus nocif qu'il est incolore et inodore, se rencontre en quantités appréciables dans l'atmosphère des villes où il provient de la combustion incomplète du charbon. Il constitue une fraction importante du gaz d'éclairage. Il est abondant dans les gaz d'échappement des moteurs à explosion ; enfin il se produit au cours de certaines fabrications industrielles.

La fumée de tabac en produit des quantités non négligeables (1 gr. de tabac = Occ.1 à Occ.3) (FLORENTIN [32] 1949). Enfin il existe en très faibles quantités dans le sang normal (Occ.1 à Occ.2 %). (NICLOUX [71]), (NICLOUX [72] en a trouvé Occ.11 % dans le sang du nouveau-né), et l'origine endogène de CO a été soutenue par LOEPPER [59] il y a plusieurs années, sans parler des nombreux cas pathologiques, en dehors de l'intoxication oxycarbonée proprement dite, où sa formation paraît incontestable (silicoses, polyglobulies, etc... CAVIGNEAUX-CHARLES 17 (1949).

CHAPITRE PREMIER

PROPRIETES PHYSIQUES

I - ETATS PHYSIQUES.

L'oxyde de carbone gazeux est la forme rencontrée presque exclusivement. Mais CO peut exister sous les trois états : (PASCAL) 78

1 - Solide à - 207°C sous la pression atmosphérique.

2 - Liquide : Il est incolore et bout à -190°C (83°K) sous la pression atmosphérique.

La densité est 0,793 à cette température. Olzewski a étudié en 1884 sa tension de vapeur.

Les constantes critiques sont :

$$t_c = 138;70$$

$$p = 34,6 \text{ atm.}$$

$$d_c = 0,3110$$

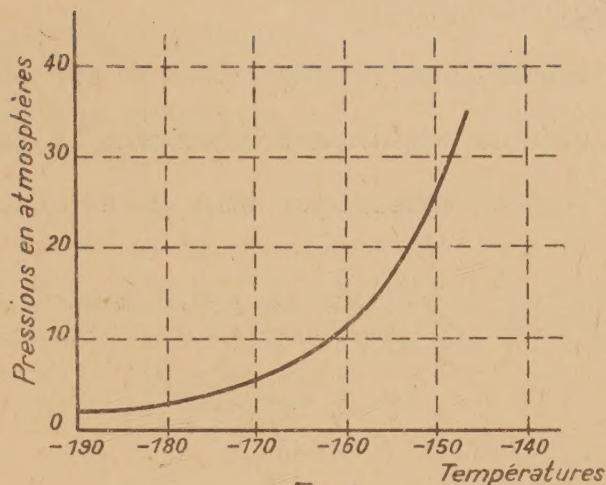


Fig.1

3 - Gazeux : CO gazeux, incolore et inodore a une densité par rapport à l'air de 0,9670 à 0°L

La courbe ci-dessous représente les variations de la quantité $\frac{pv}{p_0 v_0}$ à 0° pour une pression p_0 égale à 25 mètres de Hg.

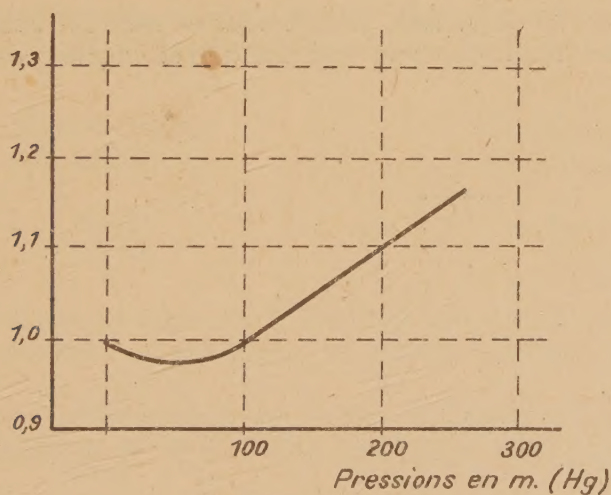


Fig.2

Lord Rayleigh a trouvé en 1905

$$\frac{pv}{p_0 v_0} \frac{0,5 \text{ atm.}}{1 \text{ atm.}} = 1,00026 \text{ à } 13;8$$

Il en a déduit la densité limite et en appliquant la loi d'Avogadro le poids moléculaire = 28,003,

II - CONSTANTES (CO gazeux)

- Le coefficient de viscosité η est 163×10^{-6} à 0°C.

CO diffuse rapidement à travers la fonte.

- La chaleur spécifique sous pression constante vaut de 25° à 100°; 0,242.

- L'indice de réfraction a été mesuré par Perreau qui a trouvé à 0° sous la pression de 760 mm de Hg et pour la raie D_1 du sodium

$$n_{D_1} = 1,0003342.$$

III - SOLUBILITE (CO gazeux)

1 litre d'eau dissout 35 cc. de CO à 0° et 25 cc. à 15° sous la pression atmosphérique. Sa solubilité dans le plasma sanguin est à peu près la même.

1000 cc. de sang en dissolvent 20 à 25 cc. Le coefficient de solubilité dans l'alcool de 0° à 25° est 0,20443.

CO est très peu soluble dans CNH.

IV - CO est facilement adsorbé à basse température par le charbon de bois, le noir de platine, le cuivre, les oxydes métalliques et la silice.

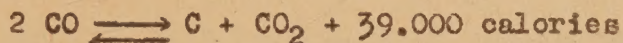
CHAPITRE DEUXIEME

PROPRIETES CHIMIQUES

Le caractère particulier de la structure moléculaire de l'Oxyde de carbone confère à ce corps des propriétés remarquables. CO est en effet un composé non saturé, dans lequel les quatre valences du carbone ne sont pas toutes occupées. L'oxygène ne sature que deux de ces valences. Aussi, CO, corps intermédiaire entre C et CO₂, présente-t-il une grande facilité de combinaisons avec de nombreuses molécules.

I - DECOMPOSITION DE CO.

A haute température et en présence de catalyseurs, CO est dissocié en C et CO₂



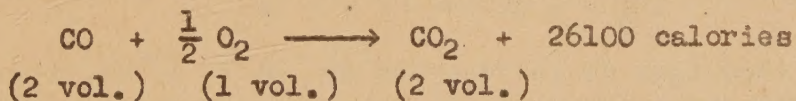
La réaction de décomposition étant exothermique, la dissociation de CO diminue lorsque s'élève la température. Vers 400° le gaz est à peu près complètement dissocié. Aux températures supérieures, la proportion de CO à l'équilibre diminue progressivement.

La décomposition de CO est accompagnée d'une contraction de moitié, de sorte qu'une augmentation de pression la favorise. Ainsi à 950°C on a :

Pressions en atmosphères	Concentrations en gaz CO ₂
0,66	0,0065
3,78	0,0317

La décomposition en C et CO₂ est catalysée par les oxydes métalliques dont CO réduit d'ailleurs un grand nombre.

- CO est inflammable et brûle à l'air avec une flamme bleue ; il donne avec l'oxygène de l'air des mélanges explosifs gazeux

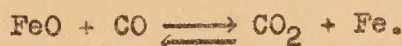
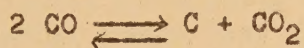


La réaction $\text{CO} + \text{O} \longrightarrow \text{CO}_2$ n'est pas complète. Elle aboutit à un équilibre; elle est facilitée par de nombreux catalyseurs tels que le Platine, le Palladium, l'Or, le Vanadium, le Nickel et le Cuivre, l'Amiante platiné, les hydrosels de platine, l'Iridium, l'Osmium, les Oxydes de Cuivre et de Nickel, etc...

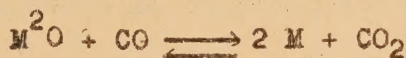
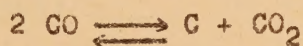
II - PROPRIETES REDUCTRICES.

Du fait de l'insaturation de son atome de Carbone, CO est un réducteur très puissant.

Il réduit un grand nombre d'oxydes métalliques. Une des principales réactions utilisées dans l'industrie métallurgique est la réduction des oxydes de fer :



Dans un sens plus général, l'équation s'écrit :



Au rouge, les oxydes de cuivre, de plomb, de fer, d'étain, de zinc sont réduits.

Le mécanisme de ces réactions se complique de la formation de métaux-carbonyles, composés gazeux.

L'Oxyde d'Argent réagit vivement à la température ordinaire :

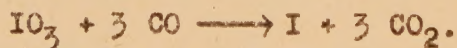


Il réduit à froid la solution de chlorure d'or trivalent qui prend une coloration rouge intense.

- Il noircit le nitrate d'argent ammoniacal.

- Le Permanganate de potassium en solution sulfurique est décoloré; la réaction est lente à froid et sa vitesse double de 15° à 25°.

- CO décompose déjà l'Anhydride Iodique dès la température ordinaire A 80°, la réaction est très rapide :



La cinétique de la réaction est celle d'une transformation monomoléculaire due probablement à la superposition de plusieurs réactions : il se formerait un complexe, puis une réaction rapide libérerait l'iode.

Cette réaction est utilisée pour doser le CO. Il y a intérêt à ne pas trop chauffer lorsque les gaz renferment des carbures d'hydrogène et à éliminer les poussières et toutes les substances organiques susceptibles de réduire I_2O_5 . (H_2S et SO_2 doivent aussi être éliminés. On titre soit l'iode libéré, soit CO_2 formé, soit les deux.

- L'Oxyde de carbone se comporte, vis-à-vis des métalloïdes des 2 premières familles, comme un corps insaturé possédant 2 valences libres. Il donne des composés d'addition



- Il réduit les sels des métaux nobles tel que chlorure de Platine, chlorure de Palladium.

Un papier imbibé d'une solution à 0,2 p.100 de Cl_2Pd brunit légèrement en quelques minutes pour une teneur en gaz égale à $\frac{3}{10000}$.

III - FORMATION DE COMPLEXES.

CO est absorbé par beaucoup de sels métalliques, et fournit plusieurs composés d'addition. Ce sont les sels des métaux suivants : Cu, Ag, Au, Hg bivalent, Fe, Co, Ni, Ru, Rh, Pd, Os, Iz, Pt.

Il est absorbé rapidement par les solutions ammoniacales ou chlorhydriques de chlorure de cuivre monovalent pour former : $\text{ClCu}, \text{CO}, 2 \text{OH}_2$ soluble.

- A 95° CO transforme le chlorure d'or Cl_3Au en COClAu .

- A la température ordinaire on observe l'addition



Ce corps est décomposable par l'eau en Pd, CO_2 et ClH .

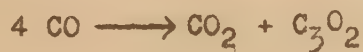
- Schutzenberger a décrit les produits d'addition



D'une manière générale, CO est susceptible d'entrer dans de nombreux ions complexes.

IV - ACTIONS DIVERSES.

Sous l'action de l'effluve, Ott a observé la réaction



Les rayons α du radium, l'arc électrique décomposent CO et l'on obtient du Carbone, de l'Oxygène et du CO_2 .

La photolyse de CO par l'Ultra-Violet est favorisée par la présence de vapeur d'eau. (taux optimum = 20 % d'eau).

Sous l'influence des radiations ultra-violettes, l'hydrogène et CO réagissent pour donner HCHO .

Le mélange de CO et d'hydrogène passant vers 230° sur du nickel réduit fournit de l'eau et du méthane



La synthèse de l'alcool méthylique est également réalisée par la réaction :



CO se combine à l'eau pour donner des traces d'acide formique



- CO, chauffé avec de la soude ou de la Potasse donne par addition un formiate



On ne sera pas étonné, après le rappel de ces propriétés chimiques fondamentales de CO, que les toxicologies aient tiré grand profit de la facilité de combustion de ce gaz et de son haut pouvoir réducteur sur les oxydes métalliques tels Ag^2O , sur les sels de métaux lourds tels Cl_2Pt , Cl_2Pd , sur l'anhydride iodique.

On comprend aussi que ce gaz, avide d'une combinaison avec les corps voisins, présentera un grand pouvoir de fixation sur les composants biologiques ferreux de l'organisme tels que les pigments sanguins qu'il atteindra en premier lieu.

CHAPITRE TROISIEME

PROPRIETES BIOCHIMIQUES.

L'action fondamentale de CO sur l'organisme est sa fixation sur l'hémoglobine. Il engendre un composé appelé indistinctement "Carboxyhémoglobine" ou "Hémoglobine oxycarbonée", structuralement semblable à l'Oxyhémoglobine. Ces composés sont désignés en abrégé : HbCO et HbO₂.

NATURE DE LA CARBOXYHEMOGLOBINE.

L'hémoglobine, type des chromoprotéides est une substance à poids moléculaires élevé ($\approx$ 68000 chez l'homme) qui résulte de l'union d'une protéine, la globine et d'un groupement prosthétique, l'hème, constitué lui-même par une porphyrine associée à un atome de fer bivalent. La porphyrine résulte de l'accolement de quatre noyaux pyrroles formant un cycle, liés entre eux au niveau de leurs carbones en α par quatre ponts méthyliques - CH = .

Dans l'hème, les atomes d'hydrogène porphyriques sont substitués par quatre groupements méthyles (en 1,3,5,8), deux groupements vinyliques - CH = CH₂ (en 2 et 4), et deux groupements propanoïques - CH₂-CH₂-COOH (en 6 et 7). L'atome de fer est à l'état ferreux ; ses deux valences le relient à deux sommets azotés des pyrroles, deux valences coordinatives l'unissent aux deux autres sommets pyrroliques de la porphyrine.

Ce groupement prosthétique, l'hème, reste identique et est retrouvé dans toutes les hémoglobines.

La Globine au contraire, spécifique de l'espèce, formée de l'association de très nombreux acides aminés, voit surtout sa teneur en soufre (méthionine, cystéine) varier suivant les espèces animales, et même légèrement chez l'homme dans les cas pathologiques.

La globine est liée au groupement ferro-porphyrinique par deux valences coordinatives de l'atome de fer, en dehors de la neutralisation réciproque probable des fonctions acides de l'hème par les groupements basiques de la globine.

Nous reproduisons ci-dessous le schéma de la formule détaillée de Hb.

.....

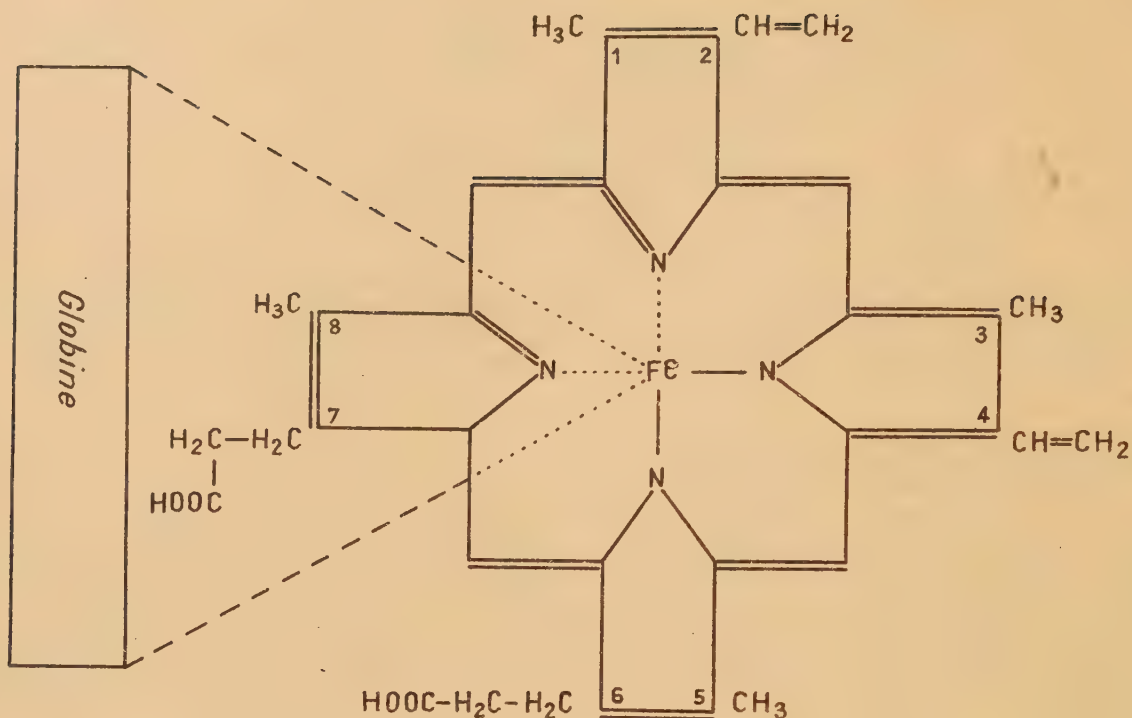


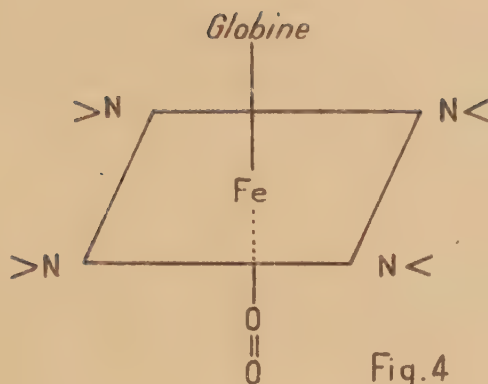
Fig.3

La fixation soit de O₂ soit de CO n'apporte aucun changement à l'état du fer qui reste ferreux. Le mode exact de fixation de O₂ sur l'atome de fer central n'est pas encore connu. Toutefois l'application des méthodes magnétiques modernes à l'étude des complexes a permis à PAULING [79] et à ses collaborateurs d'attribuer à HbO₂ et HbCO des structures qui semblent en parfait accord avec leurs propriétés. En effet, l'hémoglobine réduite Hb, a un moment magnétique égal à 4,90 μ_B (magnéton Bohr) correspondant à une liaison ionique (puisque le nombre d'électrons célibataires n dans Fe⁺⁺ est de 4 ; en appliquant la relation

$$\mu = \sqrt{n(n+2)} \quad \text{on a} \quad \mu = 4,90$$

Par contre le moment magnétique de HbO₂ et de HbCO est nul. On est donc dans ces derniers cas en présence de complexes à liaisons covalentes. De plus, la structure électronique de O₂ doit y être modifiée ; à l'état libre O₂ présente une anomalie : bien qu'ayant un nombre pair d'électrons, deux d'entre eux ne sont pas appariés et donnent à la molécule un moment magnétique important. Si donc la molécule de O₂ était seulement adsorbée sur le substrat "hémoglobine", sans liaison véritable, ce paramagnétisme subsisterait dans l'Oxyhémoglobine. PAULING [79] conclut alors à un type de liaison non déterminé entre Fe et O₂. On peut schématiser les liaisons de l'oxyhémoglobine par un octaèdre de la forme :

.....



Etant donné que la fixation de CO sur Hb est identique à celle de O₂, on est en droit de suivre le même raisonnement pour la carboxyhémoglobine.

On voit donc que la présence du fer au centre du cycle tétrapyrrolique semble conditionner la fixation de O₂ et de CO.

Un atome-gramme de Fer, par conséquent une molécule de Hb, fixe indistinctement une molécule-gramme d'oxygène ou une molécule-gramme d'Oxyde de Carbone.

(1 gr. de Hb fixe donc 1 cc.34 de O₂ ou CO).

Toutefois, la fixation de CO et O₂ participe de la présence simultanée de l'hème et de la globine. Liebecq, par exemple, a prouvé par le blocage des groupes - SH de la globine par la chloropicrine, l'incapacité totale de fixer réversiblement l'oxygène.

En effet c'est la Globine naturelle qui est responsable du caractère de réversibilité de l'action de O₂ et de CO sur l'hémoglobine. Si l'on effectue la fixation de ces gaz non plus sur Hb naturelle mais sur les hémochromogènes, résultant de l'union de l'hème ferreux avec une capule azotée artificielle, on observe une fixation irréversible.

Lorsque, dans l'hémoglobine, le fer passe par oxydation à l'état ferrique et devient trivalent, il se forme de la Méthémoglobine ou hématine globine. L'hème est devenue l'hématine.

La Méthémoglobine peut être réversiblement réduite en hémoglobine naturelle, les deux pigments sont d'ailleurs toujours en équilibre réversible suivant l'équation



CO n'a pas d'action sur les produits d'oxydation où le Fe⁺⁺ bivalent est devenu trivalent Fe⁺⁺⁺.

De même il n'agit pas sur les composés cycliques tétrapyrroliques qui ont perdu leur atome de fer, tels que les porphyrines (étioporphyrine, cuproporphyrine etc...).

Ainsi les fixations de CO et de O₂ sur l'hémoglobine des globules rouges paraissent identiques ; nous allons voir qu'il existe pourtant une différence essentielle.

EQUILIBRE DE LA REACTION.

Les premiers physiologistes GREHANT [37] et Claude BERNARD [8] étudiant le problème de la fixation de CO sur Hb, furent induits en erreur, et crurent à la fixation irrémédiable de CO sur Hb. Ce qui faisait dire à Claude BERNARD : "Tout globule touché par CO est un globule mort."



Bientôt NICLOUX [68] et les suivants vérifièrent la réversibilité de la réaction (1), et virent naître en même temps de grands espoirs dans la thérapeutique de l'intoxication.

Aussi bien avec O₂ que CO on a affaire à une réaction d'équilibre, telle que



régie par la loi d'action de masse de Guildberg et Vaage. Les réactions 2 et 3 se produisent "in vitro" quand on met en contact le gaz avec l'hémoglobine. Mais la différence essentielle entre les deux réactions réside dans la vitesse l'action des gaz.

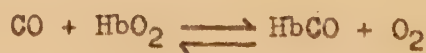
Hb a en effet beaucoup plus d'affinité pour CO que pour O₂, si bien que 1 volume de CO agit comme 220 volumes d'oxygène. Autrement dit un mélange gazeux de 1 volume de CO et 220 volumes de O₂ en contact avec Hb donne finalement un mélange contenant 50 % de HbCO et 50 % de HbO₂. On peut expliquer cette propriété par le caractère de composé non saturé qu'est CO. C'est cette grande affinité qui explique les intoxications graves mêmes dans les atmosphères pauvres en CO.

Envisageons le cas, où, comme dans l'organisme CO rencontre de l'hémoglobine oxygénée.

Il déplace O₂ de la combinaison HbO₂ suivant la réaction:



Mais là encore, il s'établira un équilibre et on devra écrire :



L'équilibre une fois atteint, on se trouve en présence d'un système comprenant HbO_2 et HbCO d'une part, et CO et O_2 gazeux à l'état libre.

Si nous appelons :

C_1 la concentration moléculaire de HbO_2

C_2 " " " " CO dissous dans le plasma

C_3 " " " " HbCO

C_4 " " " " O_2 dissous dans le plasma

on aura l'équilibre :

$$\frac{C_1 \times C_2}{C_3 \times C_4} = K = \text{Constante} \quad (4)$$

Prenons un volume total de gaz égal à 100.

Si l'on désigne par x : le pourcentage de CO dans O_2

$100 - x$ sera : le pourcentage de O_2

Si l'on désigne par y : le pourcentage en HbCO ,

les tensions des deux gaz en fraction d'atmosphère seront respectivement

$$\frac{x}{100} \quad \text{et} \quad \frac{100-x}{100}$$

Les concentrations seront donc respectivement (pour l'unité de volume) :

$$C_2 = 1 \times \frac{x}{100} \times c'$$

c' étant le coefficient de solubilité de CO ,

$$\text{et} \quad C_4 = 1 \times \frac{(100-x)}{100} \times c''$$

c'' étant le coefficient de solubilité de O_2 .

En reportant ces valeurs dans l'équation (4), on aura :

$$\frac{(100-y) \times \frac{x}{100} \times c'}{y \times \left(\frac{100-x}{100}\right) \times c''} = k$$

ce qui peut se transformer ainsi

$$\frac{(100-y)x}{y(100-x)} = k \frac{c''}{c'} = K$$

$$\frac{y}{100-y} = \frac{1}{K} \times \frac{x}{100-x}$$

$$100 Ky - Kxy + xy = 100 x$$

$$100 Ky + xy(1-K) = 100 x$$

d'où
$$y = \frac{100 x}{x(1-K) + 100 K}$$

La courbe représentée par cette équation est une hyperbole équilatère passant par deux points $x = 0, y = 0$, et $x = 100, y = 100$, qui indiquent que pour un pourcentage nul de CO ($x=0$) il n'y a pas de HbCO ($y=0$) et pour un mélange à 100 % de CO pur on a 100 % de HbCO ($y=100$).

Ces calculs théoriques ont été vérifiées expérimentalement par NICLOUX 68 dans une suite d'études remarquables ; il opérait sur le sang d'animal qu'il tenait en contact avec des mélanges de O_2 et CO en quantités croissantes de CO.

La constante K varie avec l'espèce animale envisagée. Dans le cas qui nous intéresse, chez l'homme,

$$K = 0,0045.$$

Voici reproduites les courbes établies par Nicloux, donnant pour un pourcentage déterminé de CO dans O_2 la proportion de CO dans le sang.

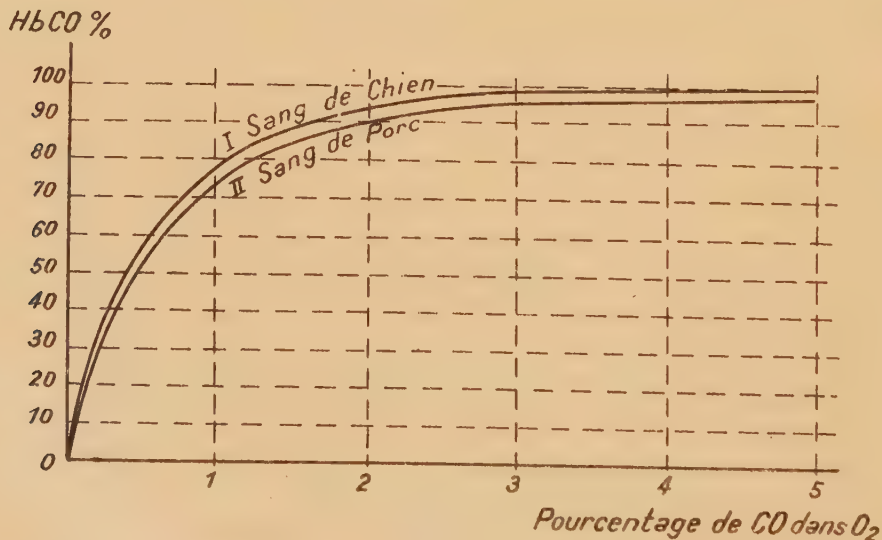


Fig.5

Si maintenant nous envisageons le cas général, rencontré dans toutes les intoxications, où le sang de l'individu se trouve en contact avec l'air atmosphérique, composé de plusieurs gaz dont CO , O_2 , N_2 et autres gaz inertes, la quantité de carboxyhémoglobine formée est fonction non pas de la tension partielle de CO dans le mélange gazeux total, mais de sa proportion vis-à-vis de l'oxygène seulement.

Ceci a été contrôlé également par les expériences de NICLOUX.

Il suffit de se reporter à la courbe ci-contre qui indique le taux de HbCO formé suivant le pourcentage de CO dans l'air.

On constate en effet que cette courbe a sensiblement la même forme que la précédente.

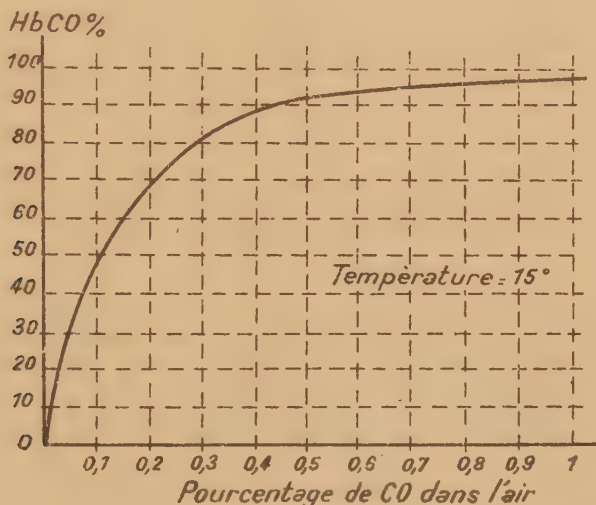


Fig.6

C'est sur les bases de cet équilibre ainsi démontré que les physiologistes ont construit la thérapeutique de l'oxycarbonisme appelé "Oxygène-thérapie". Nous n'insisterons pas sur ce sujet qui déborde du cadre de ce travail.

L'oxyde de carbone se combine-t-il avec les composés voisins de l'Hémoglobine ?

On a démontré que CO pouvait se fixer sur d'autres composés à structure tétrapyrrolique en donnant des combinaisons non dépourvues d'intérêt.

Nous avons vu qu'il entraînait en combinaison avec l'hémochromogène dans une réaction irréversible.

Il agit également sur le ferment respiratoire de Warburg, mais plus faiblement que sur l'hémoglobine (Barkan 1937). Il n'a pas d'action directe par contre sur les cytochromes.

Sa fixation sur la Myoglobine, c'est-à-dire sur l'hémoglobine du muscle a été entrevue depuis longtemps déjà par CAMUS et PAGNEZ 16 (1903). Des études récentes furent entreprises à l'étranger par BEZNAK 11 (1948) qui établit les courbes spectrales d'absorption des composés de la Myoglobine avec CO, CN, O₂ etc... Il remarqua que les deux clochers des courbes d'absorption dans la bande de SORET (entre 4000 et 4500 Å) de la Carboxyhémoglobine et de la Carboxymyoglobine étaient distants de 40 Å, et tenta d'établir sur cette propriété une méthode spectrophotométrique de dosage de la myoglobine en présence de l'hémoglobine.

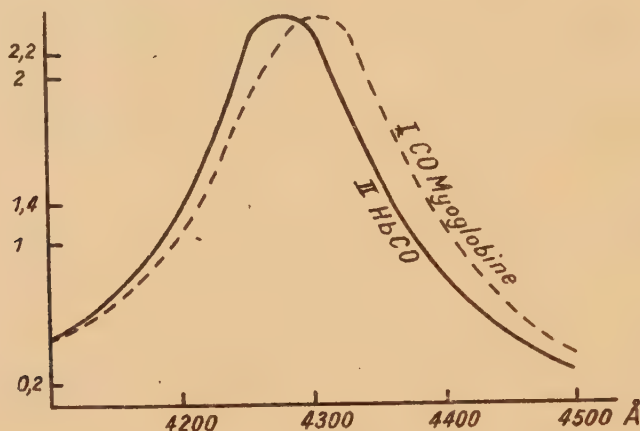


Fig.7

Les théories modernes de BARKAN [5] et LEMBERG [56] sur la dégradation de l'hémoglobine en pigments biliaires ont donné de l'importance à des produits intermédiaires de cette dégradation, que Barkan appelle la Pseudo-hémoglobine et Lemberg la Choléglobine.

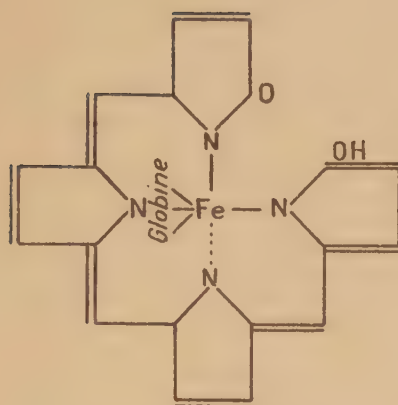
Barkan a conclu à l'existence de la pseudo-hémoglobine par l'expérience suivante : il avait remarqué que sous l'action de ClH N/10, 5 à 6 p.100 du fer total du sang étaient libérés. Ce fer ne serait pas de provenance unique, deux tiers seulement proviendraient d'une fraction que Barkan désigne (F), fixant réversiblement O₂ ou CO suivant l'équation

$$\frac{(F)O_2}{(F)CO} = K(F) \frac{O_2}{CO}$$

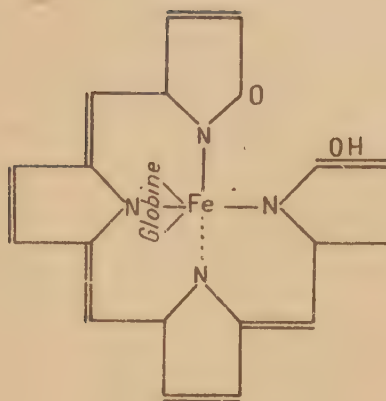
Cette équation ne diffère de celle qui s'applique à l'hémoglobine que pour la valeur de K. Mais, et c'est là le fait intéressant, tandis que l'affinité de Hb pour CO est 200 fois plus grande que Pour O₂, celle de la fraction (F) est 2000 fois plus grande pour CO que pour O₂.

Le dernier tiers du "fer labile", désigné par Barkan par (F') ne fixe ni O₂ ni CO. L'action des substances méthémoglobinisantes, le comportement vis-à-vis de O₂ et de CO indiquent que le fer est divalent dans (F) et trivalent dans (F').

BARKAN [5] désigne par "α-pseudo-hémoglobine" le composé donnant (F) et par "α-pseudo-méthémoglobine" le composé donnant (F'). Il leur attribue les structures suivantes :



α -Pseudo-hémoglobine



α -Pseudo-méthémoglobine

Fig. 8

Les spectres d'absorption du produit brut primitif seraient caractérisés par 3 bandes :

une dans le rouge à 6170 - 6200 Å

deux dans le vert à 5640 - 5680 Å

et à 5360 - 5400 Å

seule, l' α -pseudo-hémoglobine, qui nous intéresse, serait responsable de la lère bande dans le rouge.

A la même époque, vers 1933, d'autres composés, tels la Verdo-globine, la Choléglobine de LEMBERG 56 ont été décrits comme produits de passage vers les pigments biliaires. Ils existeraient en forte quantité dans le foie, et même la rate, et fixeraient CO à des taux appréciables.

Quelle que soit la forme structurale exacte de ces substances, elles présentent par leur affinité pour CO, et leur localisation un intérêt incontestable.

Nous verrons comment certains auteurs ont voulu faire un rapprochement entre la localisation de ces substances dans quelques organes sélectifs et les intoxications chroniques, où CO semble avoir été retenu dans quelque réservoir organique pour n'être mis en circulation dans le courant sanguin que par faibles quantités.

PROPRIETES SPECTRALES DU SANG OXYCARBONE.

1 - Examen du domaine des longueurs d'onde, inférieures à 7000 Å.

Si l'on trace les courbes d'absorption d'une dilution de sang pour une partie totalement oxygénée et pour l'autre totalement oxycarbonée (d'après LOTHIAN [61] 1949) on observe deux bandes α et β pour chacune d'elles, dans le visible. Les sommets de ces deux bandes sont légèrement distants surtout pour la bande α .

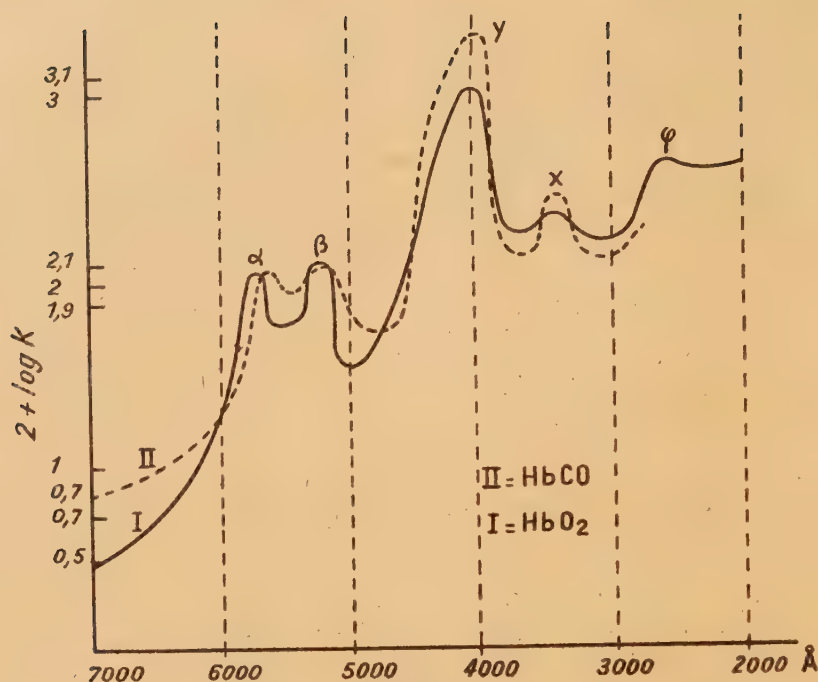


Fig. 9

En effet les maximum se situent à :

	α	β
pour HbO_2	5770 $\text{\AA}$	5400 $\text{\AA}$
pour HbCO	5700 $\text{\AA}$	5380 $\text{\AA}$

Il existe donc un écart de 70 $\text{\AA}$ entre les maximum de la bande α . Malgré ce décalage des bandes vers les courtes longueurs d'onde, dans le cas de HbCO , il est impossible de constater ainsi, à l'oeil nu, une intoxication.

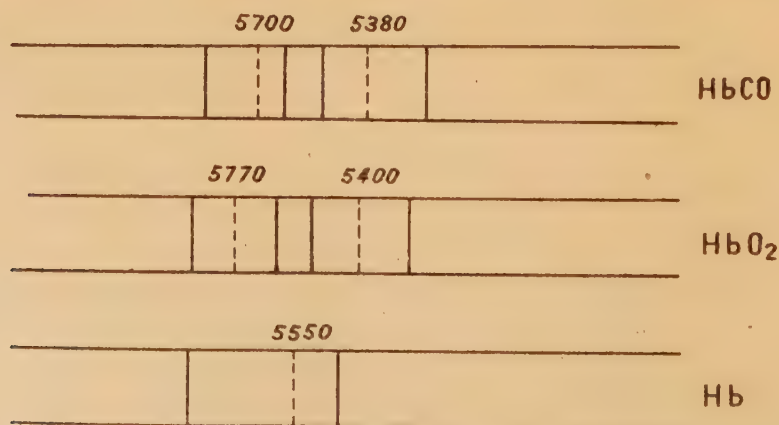


Fig.10

Mais on sait d'autre part que Hb obtenu en réduisant HbO_2 par un réducteur tel que $\text{S}(\text{NH}_4)_2$ ou $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$, ne présente plus les deux bandes caractéristiques, mais une seule dite "Bande de Stokes" dont le maximum d'absorption se situe à $5540 \text{ \AA}$. Cette réduction n'a pas lieu dans le cas de HbCO . On peut donc déceler grossièrement par cette méthode la présence de CO.

De Saint-Martin [22] prétend qu'un sang contenant 25 % de HbCO (correspondant à $1/3500$ de CO dans l'air inspiré) permet d'observer la réaction spectroscopique. Mais les avis ne sont pas unanimes à ce sujet. (Cl. BERNARD [9]) (SCHMIDT [91]).

Quoi qu'il en soit, ce décalage de $70 \text{ \AA}$ de la bande α de HbCO vers les courtes longueurs d'onde a permis à BALTHAZARD [2] d'établir sa méthode spectrophotométrique.

Examinons en effet dans le détail cette portion spectrale comprise entre $5770 \text{ \AA}$ et $5700 \text{ \AA}$. L'écart maximum est de $70 \text{ \AA}$ lorsqu'on est en présence de deux solutions à 100 % de HbO_2 et 100 % de HbCO .

Faisons maintenant des mélanges de ces solutions en augmentant de plus en plus le taux de HbCO (0,20,30,50 etc...); on observe alors que la bande α , résultant du mélange, présente toujours un maximum, situé entre $5770 \text{ \AA}$ et $5700 \text{ \AA}$ mais qui se rapproche d'autant plus de $5700 \text{ \AA}$ que la teneur en HbCO est plus forte.

La mesure du déplacement de ce maximum est faite par BALTHAZARD [2] au spectromètre et par notre méthode au microphotomètre.

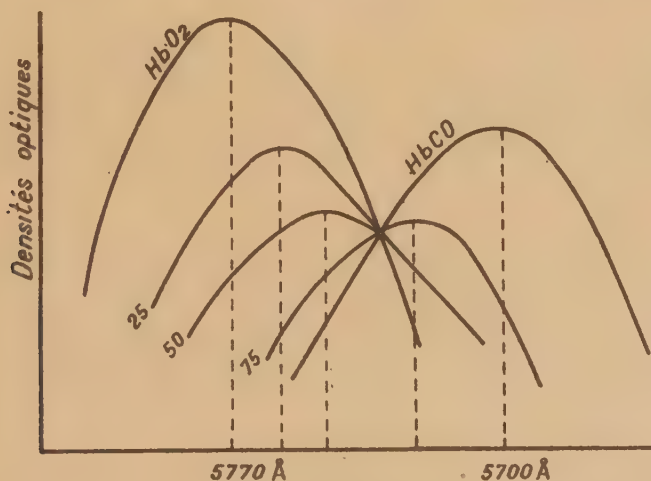


Fig.11

2 - Examen dans les longueurs d'onde supérieures à $7000 \text{ \AA}$.

L'étude des propriétés spectrales de HbCO dans le spectre Infra-Rouge est plus récente, elle date de 1936-1937 environ, époque à laquelle RIECKE [86], MERKELBACH [63], EGGERT [29], FROHLICH et RODENACHER [34] pour ne citer que les principaux montrèrent la différence d'absorption dans le

proche infra-rouge (entre 7000 Å et 14000 Å) de HbO_2 et HbCO . Aux environs de 9000 Å HbCO montre un maximum de transparence tandis que HbO_2 est opaque à l'I.R. Merkelbach a établi les courbes d'opacité que nous reproduisons ici :

- Transmission de HbO_2
 sous 10 mm. courbe c'
 sous 1,013 mm. courbe c
- Transmission de HbCO
 sous 10 mm. courbe b'
 sous 1,013 mm. courbe b
- Transmission de l'eau
 sous 10 mm. courbe a'
 sous 1,013 mm. courbe a.

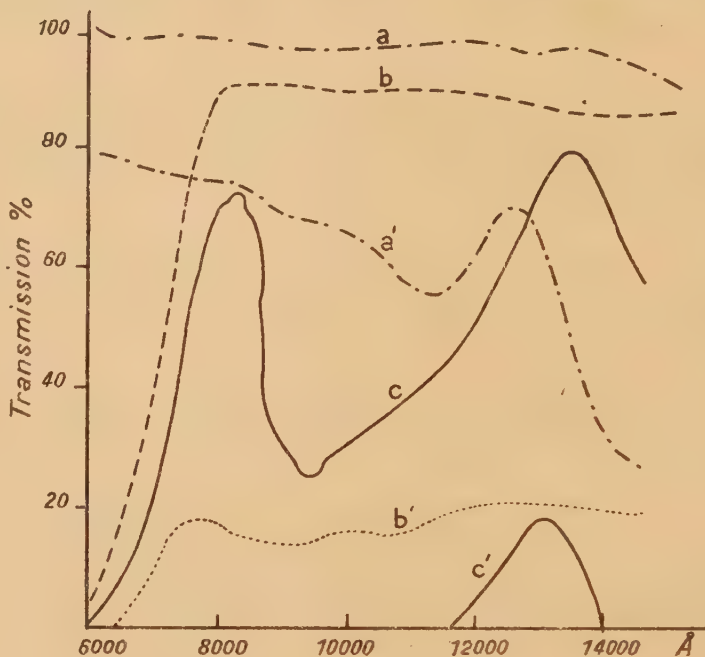


Fig.12

A 9200 Å, HbO_2 présente un maximum d'absorption tandis que HbCO est très peu absorbant. De nombreux auteurs pensèrent utiliser cette propriété pour détecter les intoxications, en espérant obtenir plus de sensibilité que par la mesure spectrographique. Nous en reparlerons en temps voulu, et nous verrons l'importance de cette propriété dans les intoxications chroniques surtout.

Car si au cours du traitement de l'intoxication aigue l'absorption réapparaît à peu près parallèlement à la disparition de l'excès de CO , il subsiste parfois longtemps dans le sang de faibles quantités de ce gaz (0cc.5 à 2cc. %), et en même temps on observe une forte transparence à l'I.R. Dans les intoxications chroniques proprement dite, la transmission à l'I.R. peut atteindre des taux de 20, 40 % et même plus, et n'est plus en rapport avec la teneur en CO observée.

Nous ne connaissons pas de travaux relatifs à l'absorption de HbO_2 et HbCO dans les longueurs d'onde supérieures à 14000 Å.

CHAPITRE QUATRIEME

PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES.

TOXICITE DE L'OXYDE DE CARBONE.

NICLOUX [68] définit la dose toxique théorique connue :

"La quantité d'oxyde de carbone dans l'air, telle que le mélange gazeux d'oxyde de carbone et d'air. Ainsi constitué, respiré par un animal, provoque la mort après un temps suffisant pour que la quantité d'oxyde de carbone dans le sang ait atteint un équilibre représenté par les deux tiers, soit 66,6 p.100 d'hémoglobine oxycarbonée."

Les deux tiers seulement de l'hémoglobine sanguine doivent être saturés en CO pour que la mort survienne.

Par cette définition, on voit que l'intoxication est fonction de plusieurs facteurs :

- La teneur en CO de l'air inspiré.
- Le temps de contact de l'individu avec cet air.
- Un facteur individuel, la "Capacité Respiratoire" définie comme le volume maximum de gaz (O_2 ou CO) susceptible d'être fixé par l'hémoglobine du sujet. Cette capacité dépend donc du taux % de l'hémoglobine sanguine. Sa valeur est approximativement 25 cc. chez le sujet normal.

Il est connu que, en moyenne, l'homme encourt le danger de mort quand il respire pendant un temps assez long une atmosphère contenant 1/500 de CO. Dans ce cas le taux de 66,6 % en HbCO est atteint rapidement (FABRE [31]).

BALTHAZARD [3] a démontré l'inocuité des faibles doses de CO. L'homme peut respirer pendant une heure un mélange à 0,3 p. % sans éprouver de sensation désagréable. D'ailleurs il est reconnu depuis longtemps que le sang des individus normaux contient de faibles teneurs de CO (Occ.07 à Occ.10 %, parfois Occ.10 à Occ.20).

Mais il suffit de faibles doses de CO dans l'atmosphère pour voir apparaître les premiers accidents, étant donné la grande affinité de CO pour Hb.

COEFFICIENT D'EMPOISONNEMENT

NICLOUX et BALTHAZARD [73], au cours de leurs études sur l'intoxication oxycarbonée, ont défini une valeur très utile dans l'évaluation de l'intoxication : "Le Coefficient d'Empoisonnement".

C'est le rapport du taux de CO contenu dans 100 cc. de sang au taux maximum de CO susceptible d'être fixé par 100 cc. de sang, c'est-à-dire à la capacité respiratoire de l'individu :

$$\frac{\text{CO } \%, \text{ en volume}}{\text{Capacité Respiratoire}}$$

On l'exprime généralement ainsi :

$$\frac{\text{Taux de HbO}_2 \text{ engagé à l'état de HbCO}}{\text{Taux de HbO}_2 \text{ totale transformée en HbCO}}$$

Dire par exemple que le coefficient d'empoisonnement s'élève à 0,25, à 0,50, à 0,66 c'est-dire que 25 %., 50 %., 66 % de l'hémoglobine totale se trouvent à l'état d'hémoglobine oxycarbonée.

Le coefficient d'empoisonnement prend tout son intérêt dans les déterminations photométriques et spectrophotométriques où il est directement donné.

Dans le tableau suivant, tiré du travail de FABRE 30, nous relevons différentes teneurs atmosphériques de CO avec leurs correspondances dans le sang du sujet et les symptômes parallèlement observés.

Proportion de CO dans l'air			Proportion de HbCO p.100 ou Coefficient d'Empoisonnement.	CO pour 100cc. de sang normal Capacité Respiratoire:2,5	Symptômes observés
en p.100 du volume total	en cc. par m ³	en fraction du vol.total			
0,00025	2,5	1/400.000	0,25	0cc.065	Néant
0,001	10	1/100.000	1,05	0cc.26	Néant
0,01	100	1/10.000	9,6	2cc.4	Léger mal de tête à la longue.
0,05	500	1/2000	34,6	8cc.6	Mal de tête sévère. Vertiges troubles de la vue. Tendance au collapsus.
0,10	1000	1/1000	51,5	12cc.9	Accélération de la respiration et du pouls. SYNCOPÉ.
0,20	2000	1/500	68	17cc.	Coma. Ralentissement du pouls et de la respiration. Mort.
0,50	5000	1/200	84,5	21cc.	Mort rapide.
1	10000	1/100	91,6	22cc.9	"

Taux d'hémoglobine oxycarbonée correspondants à différents pourcentages de CO dans l'air.

INTOXICATIONS AIGUES.

D'après les valeurs indiquées sur le tableau ci-dessus nous voyons que les accidents graves sont observés pour une teneur en CO de 10 à 13 % dans le sang.

Les symptômes observés dans l'intoxication massive sont classiques ; nous les rappelons brièvement : la céphalée intense se fait d'abord sentir, accompagnée de troubles auditifs et oculaires; l'individu s'il est conscient du danger est cependant incapable d'aucune réaction ; il est impotent au point de ne pouvoir se déplacer de quelques mètres seulement. Les nausées et les vomissements sont fréquents. L'individu tombe dans un coma profond et meurt asphyxié, la face, les téguments montrant une cyanose prononcée (lèvres et ongles violacés etc...).

INTOXICATIONS CHRONIQUES.

Les premiers symptômes observés dans les cas chroniques ne répondent pas à la même teneur de CO dans le sang; toutefois les taux supérieurs à 0cc.50 % sont considérés comme anormaux.

Si on tient compte de la petite quantité de CO d'origine endogène, on voit que le diagnostic de l'intoxication chronique, basé surtout sur des symptômes subjectifs est difficile à poser.

Les symptômes sont essentiellement :

- 1 - De la céphalée frontale.
- 2 - De l'asthénie psychique et physique.

Les sujets ont de la peine à effectuer les travaux manuels. Ils sont déprimés sans volonté ; on observe parfois une influence sur leur comportement sexuel.

- 3 - Les Vertiges, Symptômes majeurs, sont fréquents surtout au lever.
- 4 - La somnolence même dans la journée accompagnée d'ailleurs d'insomnie nocturne.

Signalons enfin des troubles secondaires qui ne peuvent suffire seuls pour caractériser l'affection :

troubles digestifs, cardio-vasculaires, respiratoires, anémie légère avec ou sans leucopénie, amaigrissement (très important chez les intoxiqués de longue date).

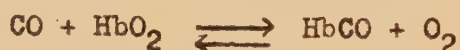
Dans de telles conditions, le clinicien est souvent embarrassé. dernièrement, G.BOURGUIGNON, F.BENOIST et A.BOURGUIGNON [13] (1950) tentèrent d'établir des tests objectifs fournis par les examens électriques, et basés sur les variations des chronaxies neuro-musculaires. Mais ils n'ob-

servent pas de relations entre leurs résultats et les dosages de CO dans le sang.

Nous allons voir en effet que le problème se complique du fait de l'élimination de CO de l'organisme.

ELIMINATION DE L'OXIDE DE CARBONE.

La réversibilité de la réaction



rend possible l'élimination rapide de CO du courant sanguin par oxygène-thérapie. Les moyens perfectionnés actuels de ce traitement permettent un prompt rétablissement de l'état du patient.

Une fois l'excès de CO éliminé, il subsiste parfois dans le sang plusieurs jours après l'intoxication aiguë, une quantité appréciable de CO (Occ. 5 à 3cc. %). Les séquelles sont fréquentes alors, et on observe des troubles nerveux tels que polynévrites, modification des réflexes etc...

DUVOIR, TRUFFERT et DEROBERT [25] [26] (1946) ont observé dans ces sangs faiblement oxycarbonés une transparence notable aux radiations Infra-Rouges, ainsi que dans les véritables intoxications chroniques.

Cette sorte de "rétention oxycarbone" a surpris bien des auteurs qui ont voulu voir dans l'organisme des éléments fixateurs, en quelque sorte de CO.

LOEPFER et TONNET [60] pensaient en 1939 qu'il pouvait y avoir fixation au niveau du foie, de la rate et des muscles.

Récemment, les études des Américains ROUGHTON, ROOT, TOBIAS et LAWRENCE [87] [88] (1945) ont apporté quelques lumières sur cette question.

Ils administraient à des sujets normaux de l'Oxyde de Carbone radioactif OC^{14} préparé avec ^{14}C et mélangé en quantités connues à de l'Oxyde de Carbone ordinaire.

Puis les sujets respiraient de l'oxygène pendant plusieurs périodes d'une heure, pendant lesquelles CO_2 expiré était recueilli.

Ils ont confirmé ceci :

- 1) CO oxydé en CO_2 par le corps atteint à peine 0,1 % du CO perdu du sang. Donc CO dans l'organisme ne subit aucune transformation appréciable, ni par oxydation, ni par tout autre processus bio-chimique.
- 2) Toute l'élimination de CO se fait par voie pulmonaire. Il n'y a pas d'élimination appréciable ni par les fèces, ni par la peau, la sueur, les urines.

Ils ont montré de plus, en plaçant un compteur Geiger sur les organes comme les muscles, la rate, le foie, qu'il existe de véritables "résér-

voirs" de CO, et que la fixation la plus importante a lieu dans le foie.

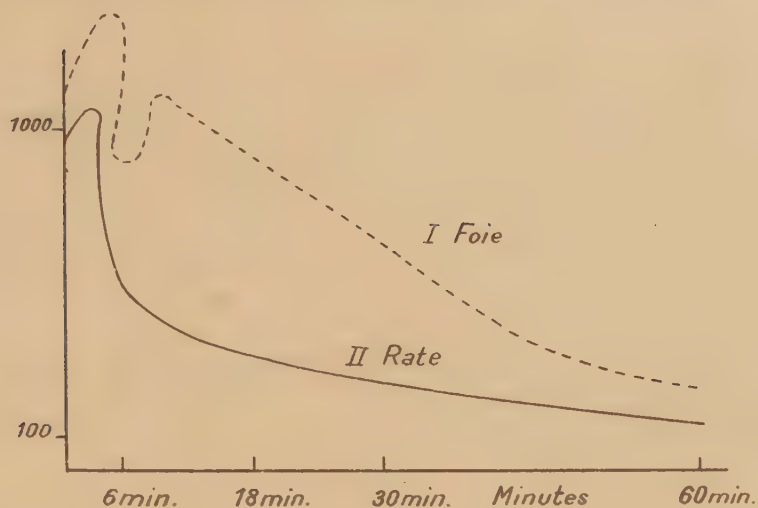


Fig. 13

Plusieurs hypothèses naquirent de ces expériences :

L'arrivée subite dans le foie d'un haut pourcentage de CO conduirait à un "engorgement" temporaire, suivi d'une "contraction" du foie qui expulserait lentement CO.

Le foie pourrait contenir soit dans les cellules de Kuppfer, soit dans d'autres cellules, des taux appréciables d'un pigment qui aurait une affinité plus grande pour CO.

Ce pigment pourrait être tout simplement la pseudo-hémoglobine de BARKAN [4] ou un pigment voisin.

Nous pensons qu'il faut établir un rapprochement entre la possibilité de fixation d'une fraction importante de CO sur le pseudo-hémoglobine (engendrant un complexe tel que CO-pseudo-hémoglobine) et le phénomène de transparence résiduelle aux Infra-Rouges. Mais c'est anticiper que de formuler ici cette hypothèse, nous verrons plus loin ce qu'il est raisonnablement permis d'en penser.

Le rôle du complexe CO-Myoglobine, semble, lui, bien discutable, puisque la quantité de CO combinée à la Myoglobine ne peut être que de 5 % de la quantité combinée à Hb du sang circulant, même quand CO a atteint la saturation. (KILLICK E.M. [48]).

Quel que soit le sort véritable de cette fraction de CO dans l'organisme on est conduit à distinguer d'une façon nette l'intoxication aiguë de l'intoxication chronique, d'où l'intérêt de pouvoir déceler avec précision de faibles teneurs en CO du sang circulant.

DEUXIEME PARTIE

Il y a deux grands moyens de déterminer la valeur d'une intoxication oxycarbonée sanguine, soit qu'on cherche à extraire le gaz CO lui-même, qu'on dose par des procédés chimiques ; soit qu'on s'attache à la combinaison HbCO proprement dite dont on fixe le taux en se basant sur ses propriétés physico-chimiques. Ce dernier type de méthodes est plus rationnel que le premier, puisque le corps à doser est atteint au sein même du milieu biologique qui le renferme.

Nous allons voir que ces deux modes d'investigation présentant chacun des avantages et inconvénients.

CHAPITRE PREMIER

METHODES CHIMIQUES de dosage de CO

Les méthodes chimiques de dosage de CO sont les plus nombreuses. Elles dérivent des principales propriétés chimiques de CO exposées antérieurement, telles que réduction des sels de métaux lourds (Palladium), formation de complexes (Chlorure cuivreux ammoniacal), réduction de l'anhydride iodique, combustion avec formation de CO_2 etc...

Jusqu'à ces dernières années, les techniques de dosage par extraction préalable des gaz ont paru les plus fidèles, et la notoriété qu'a acquise par exemple la méthode de NICLOUX [69] depuis plus de vingt ans explique qu'elle soit pratiquée encore maintenant dans la plupart des centres toxicologiques.

I - METHODES DANS LESQUELLES L'EXTRACTION DES GAZ

NECESSITE UN APPAREIL PARTICULIER.

Plusieurs dispositifs ont été préconisés pour l'extraction des gaz du sang. GREHANT [36] se servait primitivement de la trempe à mercure (1890); OGIER et KOHN-ABREST [76] (1924) l'imitèrent et imaginèrent un appareil malheureusement trop encombrant, et peu usité actuellement.

Les deux procédés en vigueur aujourd'hui sont ceux de Nicloux et de Kohn-Abrest-Truffert.

1 - Méthode de Nicloux [69]

On opère en deux temps :

- 1 - extraction des gaz proprement dite
- 2 - dosage des gaz extraits.

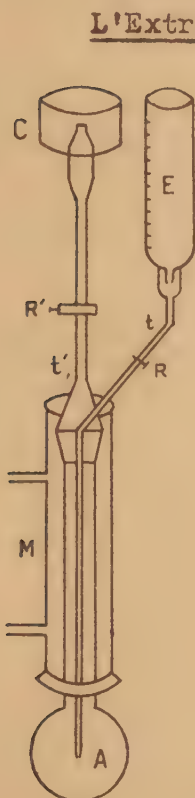


Fig.14

L'Extraction est réalisée dans l'appareil classique de Nicloux: Ballon à long col, de volume variable suivant la quantité de sang à analyser, fermé par un bouchon rodé creux, traversé par un tube *t* qui pénètre jusqu'au fond du ballon, et terminé à sa partie supérieure par un autre tube *t'*. Les tubes sont munis de robinets, et on y adapte une éprouvette *E* pour l'un et une tulipe *C* pour l'autre. Un manchon entoure le col de l'appareil et permet la circulation d'un courant d'eau froide. Le tout est plongé dans un bain de Cl_2Ca à 40° ; on fait le vide à l'aide d'une trempe à eau après avoir versé dans l'appareil de l'Acide Phosphorique à 45° Baumé étendu d'eau. Le sang est alors introduit dans l'appareil où il abandonne son CO au contact de PO_4H_3 . Après certaines précautions, le ballon est retiré du bain, refroidi, la tulipe est adaptée pleine d'eau au tube; on renverse sur cette petite cuve à eau une cloche à gaz qui coiffe le tube *t'* où on recueille les gaz après les avoir expulsés du ballon, en y faisant pénétrer de l'eau bouillie chaude.

Analyse des gaz extraits.

Le mélange gazeux obtenu contient surtout CO, CO_2 , O_2 , N_2 , et éventuellement H_2S et CH_4 . Nicloux dose CO par voie eudiométrique. Les gaz sont enflammés dans l'eudiomètre à l'aide d'un fil de platine incandescent.

On introduit dans l'éprouvette contenant le mélange gazeux à analyser et placée sur la cuve à eau, un petit tube renfermant une solution moyennement concentrée de potasse ($d = 1,35$). L'absorption se fait immédiatement. On note le volume de gaz restant, l'additionne d'un volume à peu près égal d'oxygène pur, on note de nouveau le volume et transporte l'éprouvette sur le dispositif eudiométrique. On provoque la combustion, pratique une nouvelle absorption par la potasse et on note le volume final. Les $\frac{2}{3}$ de la réduction, après absorption de CO_2 représentent le volume de CO



Le dosage se pratique sur 25cc. de sang, mais en utilisant pour la combustion des cloches spéciales de très faibles dimensions graduées au $\frac{1}{50}^\circ$ de cc. Nicloux pratique des microdosages sur 2 cc. de sang avec précision.

Les quelques modifications à la méthode original de Nicloux n'ont porté que sur des questions de détail: telles que le remplacement par de l'eau ordinaire à l'ébullition du bain de Cl_2Ca (GELMA et SIMONIN 74) (1926). BARTHE, PARIS et DELSOL [6] apportèrent une variante dans l'analyse eudiométrique (1947).

2 - Méthode de Kohn-Abrest, Truffert 50

Kohn-Abrest et Truffert inventèrent un appareil un peu différent de celui de Nicloux pour l'extraction des gaz. De plus, ils terminent l'analyse par absorption successive des gaz.

Le principe de l'Extraction des gaz est le même que précédemment : extraction sous vide à l'aide de PO_4H_3 . Seul le schéma de l'appareil est un peu différent. Nous le reproduisons ici :

L'absorption des gaz se fait sur la cuve à mercure.

On mesure exactement le volume V_1 du mélange gazeux à analyser. On ajoute un peu de sol. de KOH très concentrée au moyen d'une pipette courbe, absorbe CO_2 et mesure le nouveau volume V_2 .

La contraction représente CO_2

$$\text{CO}_2 = V_1 - V_2$$

On ajoute un fragment d'Acide Pyrogallique fondu qui forme avec KOH le Pyrogallate de Potassium; celui-ci s'empare lentement de O_2 . On attend 1/4 d'heure que l'absorption soit totale. On lit alors le nouveau volume V_3 :

$$\text{O}_2 = V_2 - V_3.$$

Truffert a signalé qu'il faut employer une solution de pyrogallate très concentrée; car en solution diluée et en présence de beaucoup de O_2 le pyrogallate peut dégager un peu de CO .

On sépare la solution de pyrogallate de potasse, et mesure le nouveau volume gazeux. On ajoute un volume égal de ClCu chlorhydrique. On lit après agitation le volume V_4

$$\text{CO} = V_3 - V_4$$

V_4 est constitué par de l'azote et des gaz inertes.

La méthode classique exige 25cc. de sang. DUVOIR, TRUFFERT et DEROBERT [26] [28] (1946) l'ont transformé en micro-méthode en utilisant des tubes spéciaux qui comportent une partie capillaire graduée au 1/1000 de cc. où l'on mesure exactement le volume gazeux et une partie plus large dans laquelle on effectue l'absorption par Cl_2Cu_2 .

KOHN-ABREST [51] lui-même utilise depuis peu (1947) des éprouvettes spéciales qui évitent l'emploi de la cuve à mercure.

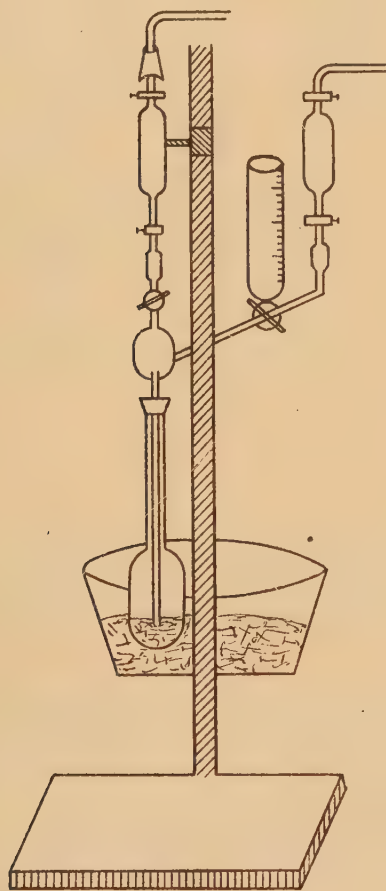


Fig.15

Enfin signalons que SAIAS et CHEVREAU 89 dernièrement (1948) présentèrent une burette à gaz qui apporte une amélioration sensible à l'appareil de Kohn-Abrest et Truffert.

Citons ici les travaux de deux auteurs qui imaginèrent des méthodes gazométriques particulières :

Méthode de Buresch [14] . En 1934, Buresch a fait connaître une méthode un peu différente des deux précédentes. Les gaz du sang sont extraits "in vacuo" avec PO_4H_3 à 65 % à 100°-120°. Le CO_2 est absorbé avec KOH et CO brûlé ensuite est absorbé par KOH. Le volume de contraction est mesuré.

Méthode de Schmidt [92] . En 1939, Schmidt publia une méthode de dosage gazométrique qui conviendrait pour les faibles quantités de CO. Il opère sur quelques cc. de sang qu'il transforme en Met Hb par addition de ferricyanure de K. Les gaz sont libérés par évacuations répétées. CO est absorbé par NaOH. Les gaz en présence de soude sont comprimés à un volume définitif (0,1 cc.) dans une burette à micro-combustion et enflammés par un fil de Platine dans une atmosphère d'oxygène. Le volume de gaz contenu dans le sang est calculé à partir de la différence de pression avant et après combustion.

Les deux premières méthodes (Nicloux et Kohn-Abrest, Truffert), malgré l'appareillage coûteux qu'elles nécessitent, sont les plus utilisées à l'heure actuelle; et si elles ne sont pas à l'abri de certaines critiques sur lesquelles nous reviendrons elles constituent pour le toxicologue le moyen le plus sûr de détection de CO dans le sang.

Nous allons maintenant décrire une série de techniques basées sur des principes différents. Bien qu'elles aient fait l'objet dans ces dernières années de nombreuses recherches, il ne semble pas qu'elles aient d'ores et déjà acquit un grand crédit. Il est vrai que certaines, très récentes, ne bénéficient pas encore du fruit d'une longue expérimentation.

II - METHODES BASEES SUR LA REDUCTION DE L'ANHYDRIDE IODIQUE.

Comme nous l'avons indiqué plus haut CO réduit I_2O_5 selon la réaction :



Partant de cette réaction, certains biologistes s'attachèrent à doser soit l'iode mis en liberté, soit le CO_2 libéré. La méthode la plus récente à ce jour est celle de BLAND [12] (1940).

Rappelons que la première méthode de dosage connue de CO fut indiquée par PILAAR [83] en 1928:

1 - HERMANNSEN et KNIPPING [45] (1932) opèrent sur un échantillon de sang hémolysé par addition de saponine, CO est libéré par $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$, et dirigé par un courant de gaz inerte sur I_2O_5 .

L'absorption de l'iode se fait en solution iodurée et on titre par $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0,01 N.

1 cc. de $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0,01 N = 0,56 cc. de CO

Les auteurs précisent que I_2O_5 doit subir un traitement préalable par passage dans un courant d'air sec. L'air est libéré des autres substances réductrices par passage à travers SO_4H_2 fumant, bain de verre, potasse, P_2O_5 , charbon activé, SiO_2 et P_2O_5 .

L'iode libéré est conduit à $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en chauffant I_2O_5 à 200° .

L'humidité doit être exclue.

2 - BLAND 12 (1940) semble attacher moins d'importance à la préparation de I_2O_5 .

Il faut réagit CO libéré de 1 cc. de sang sur I_2O_5 , sur asbeste.

L'iode est absorbé par NaOH 0,1 N et titré par addition de :

{	1 cc. Acide Arsénieux.....	0,1 N
	1 cc. IK	0,002 N
	1 cc. H_2SO_4	4 N
	et 2 gouttes de diphénylamine à 1 %.	

On détermine le temps de changement de couleur de la quantité inconnue d'Iode et on note en se reportant à une courbe le taux d'Iode correspondant au temps observé.

Bland ne donne aucune indication sur la précision de sa méthode.

III - METHODES BASEES SUR LA REDUCTION DU CHLORURE DE PALLADIUM.

La réduction du chlorure palladique a suscité de nombreuses méthodes ; dont quelques-unes très récentes: La réaction fondamentale est :



1 - Méthode de CHRISTMAN et RANDALL [20] (1933).

Son principe est le suivant :

le sang est dilué avec 2 volumes d'eau, traité par l'acide ferricyanique, et les gaz passent à travers un bulbe contenant 3 cc. d'une solution de Cl_2Pd . Après agitation de 20 minutes on ajoute 0 cc.1 d'une solution aqueuse à 10 % de $(\text{SO}_4)_3\text{Al}_2$ pour flocculer le Pd colloïdal et l'excès de Cl_2Pd est déterminé colorimétriquement après addition d'eau, d'un excès de IK et d'une solution à 1 % de gomme-gutte.

La méthode peut être employée pour des doses de CO de 1 à 50 % et n'est pas inhibée par H_2S du sang.

2 - La Méthode de WENNESLAND [97] (1940) diffère un peu de la précédente.

C'est Pd réduit qui est dosé finalement après transformation en PdI_2 . On détermine l'excès de IK.

De plus le gaz est extrait par SO_4H_2 dans un erlenmeyer qui subit une agitation de 3 à 4 heures pour permettre une plus grande diffusion du CO libéré.

GRAY et MARJORIE SANDIFORD [41] en 1946, améliorèrent les deux méthodes précédentes à l'aide d'un appareil à micro-diffusion; ils dosent colorimétriquement I_2Pd formé.

3 - Méthode de BERROD [10] (1950)

Dernièrement, Berrod, utilisant les avantages de la micro-diffusion, mit au point une technique convenant très bien pour les petites valeurs, mais malheureusement assez longue.

Le déplacement des gaz s'effectue dans un système de deux ballons s'emboîtant au moyen d'un rodage. L'un des deux ballons sert d'étalon et contient une quantité connue de solution de Cl_2Pd titrée. L'autre contient l'échantillon de sang acidifié (SO_4H_2). Le système est porté sur un agitateur tournant pendant 4 heures. Après une série d'opérations, le Pd réduit est séparé, dissout dans l'eau régale, et la solution est évaporée.

On termine par un dosage colorimétrique, en utilisant la formation d'un complexe rouge entre Pd et une solution d' α -nitro-3-naphtol, qui est dissout dans la pyridine. On lit au photomètre le Pulfrich à l'écran bleu S : 72.

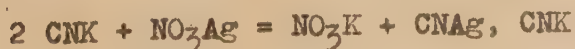
On peut par cette méthode précise doser jusqu'à 4 cc. de CO %. (ceci avec un prélèvement de sang de 10 cc.). Pour les valeurs supérieures l'auteur recommande d'utiliser un prélèvement de sang moindre.

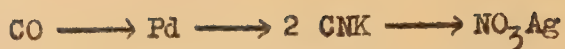
4 - Méthode de CHAMBON [19]

Enfin Chambon, au dernier Congrès de Biologie Clinique de Lyon (Mai 1950) fit connaître sa nouvelle méthode de microdosage palladométrique dont voici le principe : CO est extrait du sang (comme pour la méthode de Nicloux) et réagit dans le même appareil avec le réactif au Chlorure de Palladium : le Pd réduit, lavé, est dissout dans l'eau régale, ramené à l'état palladeux et dosé par micro-cyano-argentimétrie.

Bon

La série des transformations peut s'écrire :





$$1 \text{ cc. NO}_3\text{Ag N/1000} = 0,0224 \text{ cc. CO}$$

La méthode permet le dosage de 0,05 à 0,50 cc. % de CO.

ETUDE CRITIQUE DES METHODES CHIMIQUES.

Sans parler immédiatement des dernières méthodes, attachons-nous d'abord aux deux méthodes classiques de NICLOUX [69] et KOHN-ABREST, TRUFFERT [50] .

RAYMOND et VALLAUD [85] (1950) qualifient cette dernière de "méthode de référence que l'on devra utiliser lorsqu'il s'agira de fixer d'une façon précise la valeur de l'oxycarbonémie".

Il est certain en effet que ces méthodes ont fait leur preuve depuis longtemps, et on ne comprend pas très bien pourquoi certains auteurs, comme BURESCH 15 (1934), les discréditent, disant à tort : "La méthode de Nicloux pour le dosage de CO dans le sang est impraticable pour les dosages précis de faibles quantités, au-dessous de 10 %."

Toutefois, des études comparatives de ces deux méthodes ont montré une légère discordance dans les résultats. BARTHE, PARIS, DUCHEMIN et THOMAS [7] qui ont effectué, récemment (1949), des dosages en série en usant des deux techniques, ont prouvé que la méthode eudiométrique de Nicloux fournit des résultats légèrement plus élevés que la méthode d'absorption par ClCu de Kohn-Abrest.

La différence est imputée :

- à la présence d'autres gaz dans le sang.
- à la formation d'oxydes d'azote.
- à la préexistence dans le sang de gaz carbonés non absorbables par ClCu mais combustibles par eudiométrie.

Cet écart serait égal dans 80 % des cas à 0,22 cc. pour 100 cc. en valeur absolue.

Dans les intoxications aiguës, on conçoit qu'il ne peut y avoir de répercussions fâcheuses sur le diagnostic à poser, mais dans les intoxications chroniques où il faut déceler de très faibles valeurs, le phénomène revêt beaucoup plus d'importance.

Mais l'inconvénient primordial de ces deux méthodes réside dans l'extraction des gaz, la nécessité d'un appareillage relativement compliqué, et d'une manipulation assez longue. Et surtout, bien que Nicloux et Truffert aient calqué une micro-méthode sur leurs méthodes originelles, ces dernières exigent une quantité de sang (25 cc.) souvent gênante quand on ne dispose que de quelques centimètres cubes.

Nous n'insisterons pas sur les méthodes de BURESCH [14] et de SCHMIDT [92] qui n'ont pas trouvé beaucoup de partisans, parce que peu précises et peu pratiques.

Quant aux méthodes de réduction par l'Anhydride Iodique, elles sont justiciables du même reproche : à savoir l'obligation de l'extraction préalable des gaz.

D'autre part elles manquent par trop de spécificité. Il y a de grandes précautions à prendre dans la purification de I_2O_5 . Et comme l'a montré HERMANNSEN [45] (1932), l'air conducteur doit être libéré de toute substance réductrice. Il faut considérer l'effet de la température, de l'humidité, de l'action des substances réductrices du sang etc... autant de causes d'erreur qui font ces méthodes peu précises.

D'ailleurs les auteurs eux-mêmes ne font aucunement mention du taux de précision obtenu.

Peut-être l'analyse, gagnerait-elle en précision, comme le font remarquer ASTAPENYA, VAPNIK et ZELKIN [1] (1933), par augmentation de la surface de l'agent oxydant.

Les méthodes palladométriques, plus récentes, présentent un intérêt incontestable. Nous passons sur celles de CHRISTMAN et RANDALL 20 et de WENNESLAND [97] qui ont été perfectionnées. GRAY et MARJORIE SANDIFORD [41] les ont améliorées et surtout BERROD [10]. La méthode de ce dernier auteur évite l'extraction des gaz à proprement parler; mais la diffusion exige un temps assez long (4 heures), et les manipulations (centrifugations, filtrations, évaporations etc...) sont nombreuses au cours du dosage.

Enfin la méthode de CHAMBON [19], dernière en date, nécessite l'extraction des gaz et pour cela l'appareil de Nicloux, un prélèvement de sang important (10 cc.); elle détermine seulement les taux de CO de 0,05 à 0,50 %/..

Les réactions palladométriques ne sont pas non plus très spécifiques. CHAMBON [19] a démontré dernièrement que dès le début de la putréfaction du sang, H_2S précipite SPd .

Il a fait remarquer également le rôle nuisible des anticoagulants (citrate, oxalate, réducteurs).

Nous conclurons en disant qu'un seul échantillon de sang mobilise dans les méthodes chimiques, un appareil, de nombreux réactifs etc... et qu'il est pratiquement impossible de faire des déterminations en série.

CHAPITRE DEUXIEME

MOYENS RAPIDES DE DETECTION DE HbCO DANS LE SANG.

Quand on veut déterminer non plus CO, mais bien la combinaison HbCO telle qu'elle existe physiologiquement dans le sang, on s'adresse surtout aux propriétés physiques particulières de ce composé. Mais depuis longtemps, les auteurs ont constaté une résistance particulière aux agents chimiques de la Carboxyhémoglobine, tandis que l'Oxyhémoglobine est détruite dans les mêmes conditions.

Ainsi HbCO, de couleur rouge vif, subsistant dans la solution plasmatique est facile à observer tandis que HbO₂ dénaturée est séparée.

Nous citons à titre indicatif, quelques-unes des réactions utilisées, en ne leur accordant qu'un crédit limité. S'il s'agit souvent de procédés simples et rapides, n'exigeant qu'une prise d'essai minime de sang, il est impossible d'en faire des méthodes sûres.

I - LES BASES FORTES NaOH et KOH donnent avec le sang normal dilué un précipité brun.

Avec un sang oxycarboné on observe la coloration rouge de HbCO. Cette réaction a été utilisée par HOPPE, SEYLER et SALKOWSKY 46 .

II - LIEBMANN [58] prétend qu'en mélangeant à parties égales le sang et une solution de formaline à 10 %., il peut, grâce à la coloration rouge persistante en cas de présence de HbCO, déceler jusqu'à 15 % de HbCO.

III - ZALESKI [99] utilise la précipitation par les sels de cuivre :
le sang oxycarboné donne un trouble rouge brique,
le sang normal un dépôt brun.

IV - LA REACTION DE LEHMANN [55] serait d'après l'auteur assez sensible pour déceler 10 % de HbCO,

A 10 cc. de sang dilué au 1/5 on ajoute
5 cc. de solution de Fe(CN)₆K₂ à 2 %.
1 cc. d'Acide Acétique glacial au 1/3.

On agite et on laisse déposer. Le sang normal donne un coagulum gris-brun et le sang oxycarboné un précipité rouge-brun.

V - REACTIONS AU TANIN ET AU PYROGALLOL.

1 - Le tanin donne lieu à une réaction lisible seulement au bout de

quelques heures (WELZEL 96)

5 cc. de sang dilué au 1/5
+ 15 cc. de sol. de tanin à 1 %.

donnent un précipité rouge avec HbCO et un précipité brun-gris avec le sang normal.

2 - Le Pyrogallol, d'après KRAULAND 53 (1941) agit plus rapidement (quelques secondes seulement)

{ sang
volume égal de sol. aqueuse à 10 % de Pyrogallol.

3 - Le tanin et l'acide pyrogallique sont utilisés simultanément par SAYERS [90] qui ajoute à une dilution de sang à 5 % un volume égal de

Acide tannique.....	2 g.
Acide pyrogallique.....	2 g.
Eau distillée.....	100 cc.

La lecture se fait après agitation vive suivie d'un repos de 15 minutes. On observe la coloration rosée due à HbCO.

4 - Cette dernière réaction, reprise par KOMATU HUMIO 52 (1939), peut d'après cet auteur, conduire à une méthode quantitative assez précise (l'erreur serait réduite de 10 % à 1 %), si l'on prend certaines précautions : l'étalon doit être fait avec du sang de même espèce et CO lavé à travers une solution de KOH. De plus, les concentrations en pyrogallol et en tannin doivent être rigoureusement identiques.

VI - REACTION DE SCHOLTEN 93 (1939).

Une réaction un peu différente des précédentes a été indiquée par Scholten qui réduit, par le sang oxycarboné (CO), l'Oxyde d'Argent, en solution ammoniacale et pyridinique. L'argent métallique très dispersé donnerait une coloration brune intense se prêtant à un dosage colorimétrique.

Les réactions précédentes, pour pratiques qu'elles soient ne peuvent prétendre déceler des taux de HbCO inférieurs en moyenne à 15 ou 20 %.

Il ne semblait pas jusqu'à ces dernières années que l'on puisse tirer grande possibilité de cette qualité de "moindre résistance" de l'hémoglobine oxygénée, quand, en 1947, ERICK WOLFF [98], publia une méthode fondée sur les mêmes principes, qui s'est avérée précise même pour des teneurs assez faibles en HbCO.

Elle a retenu notre attention à cause de sa simplicité, du peu de matériel qu'elle exige.

VII - METHODE DE WOLFF [98] (1947)

1 - Principe.

Le sang dilué, est additionné d'une solution-tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium, et chauffé à 55° au bain-marie pendant exactement 5 minutes. Au bout de ce temps, HbO₂ est complètement coagulée, HbCO reste intact. Par filtration on recueille la solution de HbCO.

On dose HbCO par colorimétrie.

2 - Technique.

On dilue le sang avec de l'eau distillée (1 partie de sang pour 4 parties d'eau). On met en contact: 1 partie de ce sang dilué avec 4 parties de la solution tampon constituée par



Le pH doit être $\neq$ 5,0 - 5,1. On mélange sans agiter, et bouche le tube à essai qui est plongé très exactement 5 minutes au bain-marie à 55°. (le bain-marie doit être réglé). On refroidit vivement et filtre ou mieux centrifuge. Le liquide est clair et incolore si le sang est normal. Il est plus ou moins rouge si le sang est oxycarboné.

On effectue un contrôle par addition de S₂O₄Na₂ pour vérifier l'absence de HbO₂.

On dose l'intensité de la coloration :

- a - soit en comparant la couleur du liquide à celles d'étalons différents.
- b - soit en mesurant au Pulfrich le coefficient d'extinction du filtrat
- c - la méthode préconisée comme la meilleure par l'auteur est celle-ci

On sature par CO (gaz d'éclairage) une portion de sang dilué au 1/4. On fait subir les mêmes opérations que précédemment à ce sang saturé de HbCO. Finalement on fait la colorimétrie photoélectrique comparative des deux filtrats (en se servant d'un filtre vert de Gibson). On a ainsi la proportion de HbCO.

Si l'on respecte scrupuleusement les conditions d'opération cette méthode est sensible et permet de doser avec précision jusqu'à 3 % de HbCO. (correspondant à une saturation de 3 % d'hémoglobine totale) soit pour une capacité respiratoire normale) environ 0 cc.75 % de CO.

Nous avons longuement expérimenté cette méthode. Nous confrontons les résultats qu'elle fournit avec eux donnés par la méthode de NICLOUX 69 et notre méthode optique. Nous renvoyons à la fin de ce travail pour l'exposé comparé de ces résultats.

Disons ici que la méthode de WOLFF [98] constitue un grand progrès dans la série de réactions utilisant la résistance particulière de HbCO aux agents chimiques, et qu'on ne peut la considérer, à l'inverse des précédentes, comme une simple réaction qualitative.

Signalons enfin que, en 1942, un compatriote de WOLFF, NORBERG 75 avait décrit un procédé similaire mais moins précis.

CHAPITRE TROISIEME

METHODES PHYSIQUES PHOTOMETRIQUES

Suivant une tendance générale de l'analyse moderne qui consiste à déterminer un corps tant en évitant de l'extraire de son milieu, les biologistes s'orientèrent rapidement vers les procédés physiques pour doser HbCO .

Les méthodes physiques ne nécessitent qu'un prélèvement très minime.

Plusieurs méthodes photométriques prirent naissance qui pour la plupart exigent l'emploi du photomètre de Pulfrich.

Nous rappelons à ce propos les lois générales d'absorption de la lumière qui régissent le phénomène.

I - Lois d'Absorption dites de Beer-Lambert.

L'affaiblissement de l'intensité du rayon lumineux monochromatique qui traverse une matière colorante ne dépend que du nombre de molécules rencontrées ; c'est-à-dire que l'absorption est fonction à la fois de l'épaisseur et de la concentration. Si l'épaisseur est constante l'absorption varie dans le même sens que la concentration, et réciproquement.

Si l'on désigne par :

I , l'intensité du faisceau de lumière transmise

I_0 , " " " " " incidente

ℓ , l'épaisseur de la solution colorée traversée

c , la concentration moléculaire de la solution.

La loi précédente se traduit par la formule :

$$I = I_0 e^{-Kc\ell} \quad (1)$$

dans laquelle e : est la base des logarithmes népériens et K est une constante qui ne dépend que de la substance et de la radiation utilisée.

Cette loi, en effet, ne s'applique d'une façon stricte que si on utilise une radiation monochromatique. Si on emploie non plus une seule longueur d'onde, mais une bande étroite du spectre, la loi s'applique grossièrement encore. Plus la bande est large, plus nous nous écartons de cette loi qui n'est par conséquent plus du tout valable dans le cas de la lumière blanche.

Le pouvoir absorbant d'une solution peut être exprimé par le rapport :

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\text{Intensité transmise}}{\text{Intensité incidente}}$$

C'est le rapport de transmission.

L'équation (1) indique que I varie exponentiellement par rapport à ℓ ; on a donc cette courbe-ci :

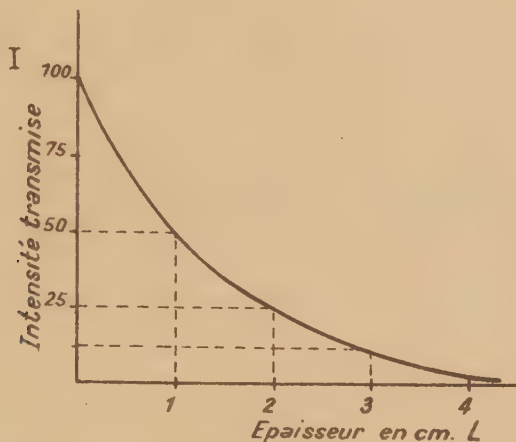


Fig. 16

Pour des raisons de commodité on exprime plus souvent le pouvoir absorbant par une autre valeur : la Densité optique D que l'on obtient ainsi :

Transformons l'équation (1) précédente :

$$Kc\ell = -\log I + \log I_0 = -\log \frac{I}{I_0}$$

et en passant aux logarithmes vulgaires :

$$Kc\ell = -\log \frac{I}{I_0} = \text{colog} \frac{I_0}{I}$$

La valeur $D = \log \frac{I_0}{I}$ est la Densité optique.

Elle dépend de la nature de la substance, par la constante K , de la concentration moléculaire c et de l'épaisseur ℓ , elle est valable pour une longueur d'onde déterminée. La courbe donnant D en fonction de ℓ est une droite.

On l'appelle encore rapport d'Extinction ou tout simplement Extinction.

- Le Coefficient d'Extinction est la densité optique pour une épaisseur de 1 cm.

$$E = \frac{D}{\ell}$$

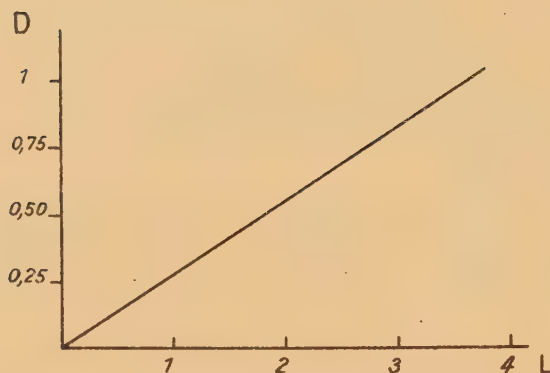


Fig.17

- Le Coefficient d'Extinction moléculaire est égal à $\frac{D}{c \ell}$. Il caractérise le corps absorbant et est indépendant de l'épaisseur et de la concentration.

Dans les méthodes décrites pour le dosage de COHb on procède à la mesure soit de D soit de E.

C'est presque toujours le photomètre de Pulfrich qui est employé.

II - Méthodes Photométriques.

1 - Nous citerons pour mémoire la méthode de Grut 38 qui n'utilise pas le photomètre classique mais un hémomètre spécial imaginé par l'auteur.

Le sang étudié, prélevé par piqure au bout du doigt, est hémolysé réduit et stabilisé par dilution convenable avec un réactif contenant $S_2O_3Na_2$, de l'oxalate de sodium et de la saponine. On compare à l'hémomètre la solution sanguine à un étalon coloré et on procède à l'égalisation des teintes par réglage en épaisseur et interposition d'un écran bleu d'une intensité variable.

On obtient ainsi directement sur la double graduation de l'appareil d'une part la teneur totale du sang en hémoglobine (libre et combiné), d'autre part, le pourcentage cherché de HbCO.

2 - Méthodes Photométriques proprement dites.

La valeur des méthodes photométriques est conditionnée par le choix de la région spectrale dans laquelle on opère. On utilise pour cela des filtres colorés appropriés qui permettent une sélection plus ou moins parfaite des longueurs d'onde intéressantes.

On sait en effet que le spectre d'absorption de HbCO montre 2 maximum d'absorption à 5700 Å et 5380 Å. HbO₂ a deux bandes à 5770 Å et 5400 Å et l'hémoglobine une bande à 5650 Å.

a) Méthode de PARNAS et SIENAWSKI [77] (1933)

C'est une des premières méthodes décrites. Ils opèrent en

lumière blanche, sur les dilutions de sang au 1/200° comportant 0,1 % de CO_2Na_2 . L'absorption est mesurée avec des épaisseurs constantes dans les cuves du Pulfrich, avec les filtres S_{53} et S_{43} .

On détermine l'Extinction spécifique relative.

Soit n le % de HbCO de la solution à doser.

Dans une cuve on a :

$$\frac{n}{100} \text{ cc. HbCO} + \frac{100-n}{100} \text{ cc. HbO}_2$$

Dans une autre :

$$\frac{n}{100} \text{ cc. HbCO} + \frac{100-n}{100} \text{ cc. HbCO}$$

D'où la formule donnant le taux de HbCO :

$$n = 100 - \frac{100 \times E_x}{s \times K \times E_{100\%}}$$

dans laquelle :

n = % HbCO

s = épaisseur des cuves en cm.

K = concentration en Hb du sang %.

E_x = Coefficient d'Extinction relative d'une solution de sang complètement saturée en CO par rapport au sang à mesurer.

$E_{100\%}$ = Coefficient d'Extinction relative d'une solution de Hb à 1 % complètement saturée en CO par rapport à une solution de même concentration saturée en O_2 .

b) En 1937, GIGON et NOVERRAZ [35] publièrent une méthode peu différente de la précédente et qui se résume ainsi :

- On détermine la valeur de Hb sanguin.

- On dilue ce sang par CO_2Na_2 à 0,5 % et des traces de saponine jusqu'à 3 % en Hb.

- On détermine le % C de la lumière transmise par la solution de Hb à 3 % (filtre vert S_{54}) et on calcule le % R de la lumière qui serait transmise par le sang non empoisonné et après réduction selon la formule

$$R = 1,3 C + 2$$

- On calcule le coefficient d'empoisonnement

$$1 - \frac{E}{E_0}$$

E : coefficient d'extinction de la solution empoisonnée réduite.

F_0 : coefficient d'extinction du sang non empoisonné.

Ces auteurs prétendent déceler jusqu'à 10 % de HbCO.

Pour eux les limites de lecture des procédés spectrographiques ne descendaient pas au-dessous de 25 %.

c) MAY [62] (1937) préconise la même méthode que Parnas et Sienawski, mais il utilise comme source la lampe à vapeur de mercure.

Sous l'impulsion de May, plusieurs auteurs firent connaître des méthodes qui se ressemblent étroitement ; citons celles de RANKE et SEYDEL [84] (1941), de DETTEL [21] en 1943, et la dernière en date, de Pieters et Hanssen (1948).

d) Méthode de PIETERS et HANSSSEN [82] (1948)

Voici le principe même de la méthode, indiquée par les auteurs :

Dans le sang hémolysé l'oxyhémoglobine est réduite par $S_2O_4Na_2$.

L'hémoglobine est oxydée par agitation de l'échantillon avec l'air

Puis l'extinction de la solution est mesurée à deux longueurs d'onde spécifiques. Le quotient des extinctions

$$\frac{F_{\lambda_1}}{F_{\lambda_2}} \text{ est fonction de la teneur en CO.}$$

Les longueurs d'onde optimum seraient pour ces auteurs 5730 et 5390 Å pour le spectre de HbCO et 5780 et 5400 Å pour HbO₂.

La mesure est faite au photomètre de Leifo, avec une lampe à vapeur de mercure, à l'aide des filtres 570 et 550.

"L'extinction à concentration de solution constante est une fonction linéaire de la teneur en HbCO ou en HbO₂."

Soit x % la quantité d'hémoglobine transformée en HbCO. Les extinctions sont

$$E_{\lambda_1} = E_{x\% \text{ HbCO}}^{578}$$

$$= \frac{x}{100} E_{100\% \text{ HbCO}}^{578} + \frac{100-x}{100} E_{100\% \text{ HbO}_2}^{578}$$

$$E_{\lambda_2} = E_{x\% \text{ HbCO}}^{546} = \frac{x}{100} E_{100\% \text{ HbCO}}^{546} + \frac{100-x}{100} E_{100\% \text{ HbO}_2}^{546}$$

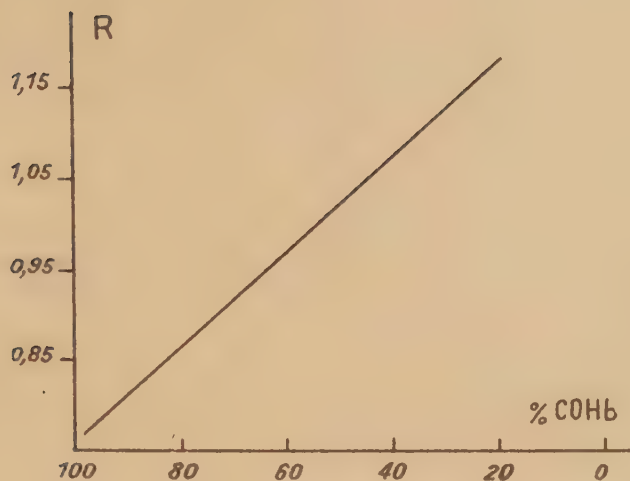


Fig.18

$$Rx = \frac{F_{\lambda_1}}{F_{\lambda_2}} = \frac{F_{578}}{F_{546}}$$

Pieters et Hanssen prétendent doser jusqu'à 2 % de CO.

D'autre part, ils démontrent que le sang hémolysé à l'aide d'une solution de CO_2Na_2 perd rapidement son CO au contact de l'air, tandis qu'avec la saponine la concentration est constante.

Nous verrons plus tard quel est en réalité l'influence de l'effet-tampon sur les solutions de HbCO et HbO_2 diluées.

ETUDE CRITIQUE DES METHODES PHOTOMETRIQUES.

Les méthodes photométriques présentent des qualités indéniables: la simplicité, la rapidité de la mesure et surtout la faible quantité de sang qu'elles exigent séduisent de prime abord l'expérimentateur.

C'est ainsi que les auteurs précités opèrent avec 0,1 cc., 0,2 cc., 0,3 cc. de sang. Une simple piqûre au doigt ou au lobe de l'oreille suffit donc. L'économie est parfois obligatoire dans les prélèvements sanguins, chez l'adulte, et à fortiori chez les enfants en bas-âge où la ponction veineuse est rendue impossible.

A propos de la rapidité de la technique, on peut relater le temps de [8] minutes indiqué par MAY [62] pour la durée totale de sa mesure.

Remarquons en outre que la détermination donne directement le coefficient d'empoisonnement.

Cependant, ces méthodes ne sont pas employées couramment car elles présentent de très graves défauts, à savoir l'impossibilité de doser des taux de $\text{HbCO} < 10 \%$.

Dans le cas des méthodes de PARNAS et SIENANSKI '77 , GIGON et NOVERRAZ 35 , il est évident que l'usage des filtres S_{53} , S_{43} etc... ne suffit pas pour sélectionner les longueurs d'ondes intéressantes. La solution colorée, loin de recevoir un faisceau de lumière monochromatique de longueur d'onde optimum, reçoit une portion plus ou moins étendue du spectre, suivant la qualité des filtres employées.

Les écrans du photomètre de Pulfrich délimitent dans le spectre des bandes d'au moins 500 Å, soit le 1/6 environ du spectre visible. Il est impossible dans ces conditions d'opérer avec précision. Le taux limite inférieur de 10 % en HbCO, susceptible d'être décelé par Gigon, nous semble même un peu faible.

MAY [62], RANKE et SEYDEL 84 , et surtout PIETERS et HANSSEN 82 ont cru tourner la difficulté en utilisant les radiations monochromatiques de la lampe à vapeur de Mercure, et les filtres 570 et 540 pour isoler les radiations 5780 et 5460 Å du mercure (raies jaunes et raie verte). Mais les maximum de transmission de ces filtres ne correspondent pas aux longueurs d'ondes optimum des bandes d'absorption de HbCO et HbO₂, et leur sélectivité n'est pas suffisante.

D'autre part l'intensité en spectre de fond continu émis par le quartz chauffé de la lampe n'est pas négligeable. Quant à l'intensité lumineuse éclairant la solution, elle est très affaiblie dans ces conditions; sur une dilution de sang à 1 % ou 2 %, la détermination est donc difficile.

Par ailleurs nous sommes surpris de lire dans le compte-rendu de May que la solution saturée de HbCO est obtenue en faisant barboter 1 minute seulement le gaz d'éclairage dans le sang. BALTHAZARD 2 le premier avait constaté que le temps nécessaire pour arriver à saturation était beaucoup plus long (20 minutes à 30 minutes) et nous l'avons vérifié nous-mêmes au cours de notre expérimentation.

Dans le texte original de Pieters et Hanssen nous relevons : "Les spectres d'absorption de HbCO et HbO₂ ont leur maximum (pour la bande α) à 5730 Å et 5780 Å". Pourtant il est de notion classique que les vrais maximum de cette bande soient respectivement à 5700 Å et 5770 Å. Des erreurs aussi importantes sur de telles notions permettent de douter des résultats de ces auteurs.

Ainsi les méthodes photométriques, loin d'apporter les résultats espérés, ne permettent que des déterminations grossières. La rapidité de leur exécution n'a d'ailleurs pas suffi à les faire admettre par les expérimentateurs comme des méthodes sûres.

CHAPITRE QUATRIEME

METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES

La spectrophotométrie est une conséquence de la loi générale de Beer-Lambert. On mesure l'affaiblissement de l'intensité lumineuse du faisceau ayant traversé la solution colorée. C'est le rapport $\frac{I}{I_0}$ de l'intensité à la sortie à l'intensité incidente qui est déterminé : c'est la "transmission". Dire que ce rapport vaut 0,55 c'est dire que l'intensité transmise n'est plus que de 55 % de l'intensité avant la traversée de la solution à mesurer. Cette mesure de l'affaiblissement se fait pour une longueur d'onde unique. La spectrophotométrie d'une substance définit donc la nature même de cette substance. C'est ce qui la distingue essentiellement de la photométrie. La mesure spectrophotométrique comprendra :

- 1) Le choix de la région spectrale.
- 2) La mesure du rapport $\frac{I}{I_0}$
- 3) La détermination de la constante d'absorption K.

1 - Dans le cas présent, nous connaissons les régions du spectre à explorer : celles qui correspondent aux maximum d'absorption des pigments HbO₂ et HbCO.

HbO₂ présente 2 bandes d'absorption dont les maximum sont situés
à 5770 Å et 5430 Å

HbCO " " " 5700 Å et 5360 Å.

La région qui nous intéresse est celle où le plus grand écart est observé entre HbO₂ et HbCO, soit entre 5700 Å et 5770 Å.

2 - La mesure du rapport $\frac{I}{I_0}$ se fait de la manière suivante. Deux faisceaux de lumière identiques sont décomposés par un prisme et deux faisceaux monochromatiques sont isolés. L'un n'est pas modifié, l'autre traverse la solution colorée. On compare les intensités que présentent ces deux faisceaux, et on répète cette mesure pour chaque longueur d'onde dans la région spectrale située entre 5700 Å et 5770 Å.

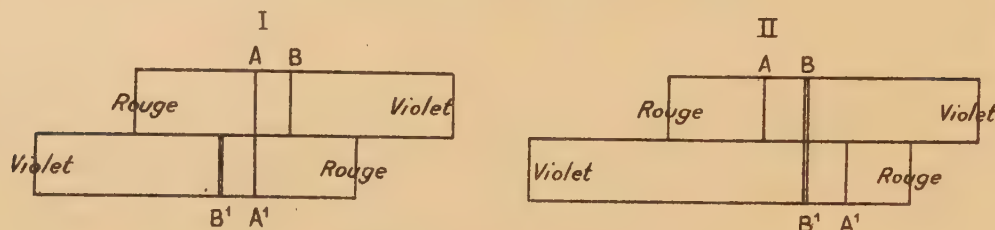
3 - Le facteur K est déterminé en mesurant la capacité respiratoire du sang expérimente.

I - Méthode de HARTRIDGE [43] (1912)

HARTRIDGE [43] fut le premier à faire connaître "a spectroscopie method of estimating carbon monoxide".

Le schéma suivant indique la technique d'une mesure faite avec son spectroscope à réversion. On passe de la position I où les raies AA' sont en coincidence à la position II où les raies BB' sont en coincidence.

Le déplacement relatif de deux spectres inverses, mesuré sur un tambour, donne l'écart des deux raies AB.



Déplacement entre I et II

Fig. 19

Le spectroscope à réversion est un spectroscope à réseau dans lequel on obtient par réflexion deux spectres juxtaposés et en sens inverse (le rouge de l'un étant du côté du violet de l'autre). En modifiant par un vis graduée l'inclinaison de l'appareil réflecteur on déplace un spectre par rapport à l'autre. Si l'on cherche à mettre en coïncidence successivement les homologues des deux raies les deux spectres juxtaposés, on mesure l'écart des deux paires de raies avec une précision double de celle qu'on aurait dans le simple repérage micrométrique par visée dans le spectre.

On n'atteint pas cependant la précision donnée par les mesures au spectrophotomètre, type "Jobin et Yvon", avec lequel Balthazard établit sa méthode.

II - Méthode de BALTHAZARD [2] (1924).

1 - Description du Spectrophotomètre type "Jobin et Yvon".

Le faisceau émis par la source S est divisé en deux ; l'un (1) traverse la cuve C contenant la substance absorbante, éclaire les deux plages externes d'un cube de Lemmer et Brodhun et vient former image de la source sur une fente à ouverture réglable.

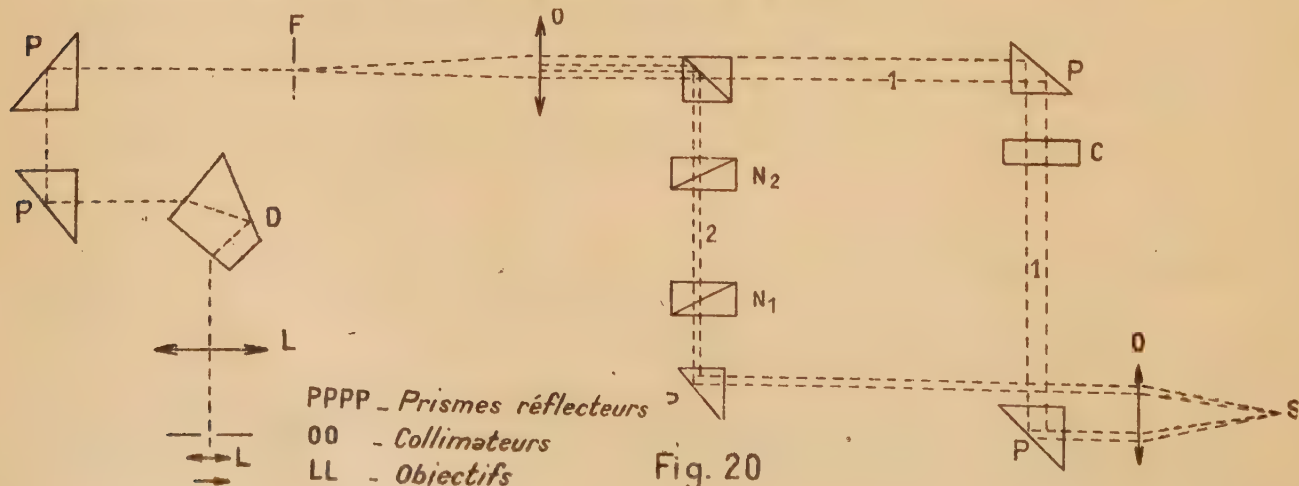


Fig. 20

Le faisceau (2) traverse un nicol n_1 , mobile dont la rotation est mesurée par un cercle divisé, puis un nicol fixe n_2 , éclaire la plage centrale du cube de Ianmer et Brodhan et vient également former une image de la source sur la fente F. A partir de ce moment les faisceaux suivent le même trajet et traversent un prisme dispersif D montré sur une plate-forme mobile. La rotation de cette plate-forme est commandée par un plateau spiralé gradué en longueurs d'onde. Les 2 spectres se forment dans le plan d'un diaphragme A, portant 2 fils verticaux. Devant le diaphragme deux volets mobiles à la main permettent d'encadrer la région spectrale sur laquelle on veut opérer. Le réglage effectué on montre un oculaire V sur un viseur muni d'objectif qui permet d'observer l'image des plages. Après avoir amené la bande d'absorption entre les fils verticaux, on réalise l'égalité de pé-
nombre, et on lit sur le cercle gradué la longueur d'onde correspondante.

Le cercle du spectrophotomètre est gradué en longueurs d'ondes en multiples de dix unités angstroms, mais on peut lire facilement les tiers de division. Si la longueur d'onde déterminée est inférieure à 5770 Å on peut dire qu'il y a oxycarbonémie. L'auteur a établi une courbe qui donne le coefficient d'empoisonnement en fonction de la longueur d'onde.

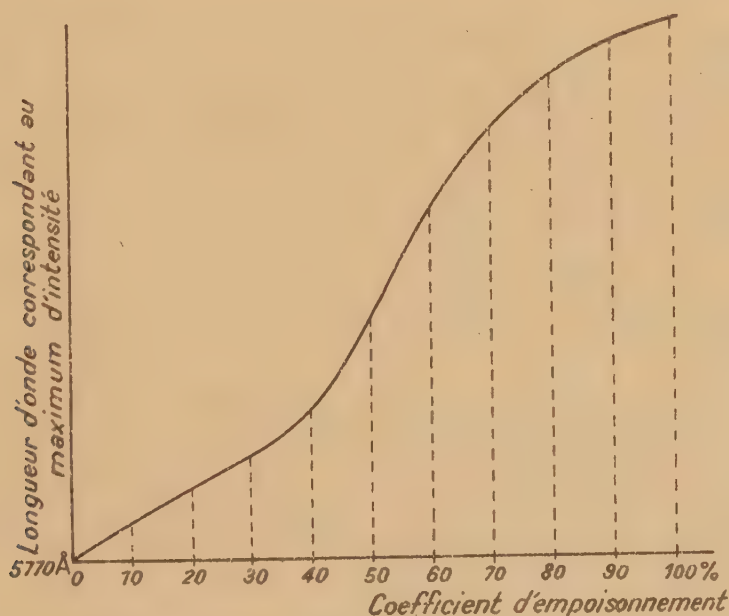


Fig.21

D'après l'auteur il est possible de déterminer la position du maximum d'intensité à 3 Å près.

Comme on opère sur un écart total de 70 Å, 3 Å correspondent donc à environ 5 % de HbCO : 5 % est la grandeur de l'erreur théorique minimum de la méthode.

2 - Critique de la méthode de Balthazard.

Quoi qu'en dise FREDERICK 33 (1931) qui prétend mettre en évidence de très faibles quantités de CO dans le sang à l'aide du spectromètre de Hartridge, nous pensons que seule la méthode de Balthazard présente un

grand intérêt. Elle constitue en effet une grosse amélioration sur les techniques photométriques précédemment citées. Aux avantages que présentent ces dernières, à savoir, le prélèvement minime (1 goutte suffit); la rapidité d'exécution, il faut joindre l'avantage de la sélection des longueurs d'onde qui donnent à la méthode sa valeur. L'erreur de 5 % n'est pas trop grande dans les fortes intoxications. Malheureusement il est difficile, même pour un oeil exercé de déterminer le taux de HbCO inférieur à 8 %. Les avis des auteurs d'ailleurs ne concordent pas à ce sujet ; certains prétendent que le taux limite est de 15, 20 et même 22 % en HbCO.

Au cours de nos expériences, il nous a été donné de faire des déterminations en série au spectrophotomètre, et il nous a été impossible de descendre au-dessous de 10 % en HbCO. Remarquons, de plus, que comme dans toutes les mesures visuelles, l'expérimentateur est souvent victime de la fatigue de son oeil surtout s'il a été contraint à de nombreuses déterminations successives.

Il n'est donc pas question d'appliquer la méthode de Balthazard au dosage de faibles quantités de CO dans le sang et en particulier au cas des intoxications chroniques.

3 - Essais de dosage de CO à l'aide de la Spectrométrie Infra-Rouge.

Négligeant les propriétés des bandes d'absorption de HbCO dans le spectre visible, au cours de ces dernières années, plusieurs auteurs se tournèrent vers les spectres infra-rouges des pigments sanguins, pensant trouver là les méthodes de choix pour la détection de CO dans le sang. Nous allons mentionner brièvement les tentatives faites dans cette voie.

FROHLICH et RODENACHER [34] furent parmi les premiers en 1935 à constater les différences d'absorption dans le rayonnement Infra-Rouge de la Carboxyhémoglobine, de l'Oxyhémoglobine et de l'hémoglobine réduite.

C'est l'année suivante que Martha RIECKE [86] dans sa thèse, essaya de doser HbCO dans le sang. Elle mettait en garde contre le danger qu'il y avait de confondre l'hémoglobine réduite et la carboxyhémoglobine. En effet ces 2 pigments présentent la même transparence pour les courtes longueurs d'onde et les grandes longueurs d'onde. Elle opérait avec un filtre noir α n° 83 ne laissant passer que les longueurs d'onde allant de 7600 à 8400 Å.

On sait maintenant grâce aux travaux de DUVOIR, TRUFFERT [28] (1943) qu'il faut opérer le plus près possible de la longueur d'onde optimum $\lambda = 8350$ Å pour laquelle l'hémoglobine réduite et l'oxyhémoglobine ont la même absorption. Duvoir utilise les filtres ne laissant passer que les radiations comprises entre

$$\lambda = 8000 \text{ Å} \quad \text{et} \quad \lambda = 8500 \text{ Å}$$

DUVOIR et TRUFFERT 28 en 1943 concluant qu'après réduction par $S_2O_4Na_2$ la transparence du sang semblait proportionnelle à la teneur en CO, pensèrent mettre au point une technique de dosage.

Ils pensèrent d'abord utiliser un photomètre à cellules photo-électriques sensibles à l'Infra-Rouge, mais furent arrêtés par les erreurs

de diffusion qui entachent les mesures photo-colorimétriques en milieu trouble dans cette région proche du visible. Ils songèrent alors au colorimètre intégrateur à sphère de Dognon ; leur intention était de dépasser la sensibilité des méthodes spectrographiques visibles.

Nous n'avons pas relevé dans les publications ultérieures de ces auteurs de notes ayant trait à ce dosage. Cependant il faut signaler qu'en 1944, HORECKER et BRACKETT [47] utilisant un photomètre à cellule photo-électrique sensible à l'Infra-Rouge tentèrent d'établir un mode de dosage de la Méthémoglobine et de la Carboxyhémoglobine dans le sang : sur chaque échantillon on procède à 3 mesures d'absorption. La première mesure dans l'Infra-Rouge donne la densité D_1 . Le même échantillon est traité ensuite dans la cellule d'absorption par CNK pour convertir la MetHb en CNHb et on mesure la densité D_2 dans le même intervalle de longueur d'onde. L'échantillon est alors dilué et une troisième détermination est faite dans le spectre visible. Les résultats seraient paraît-il satisfaisants.

Cette méthode n'est certainement pas valable dans tous les cas, car des observations ultérieures ont montré que le phénomène se compliquait du fait des intoxications chroniques, comme nous l'avons souligné dans la 1ère partie de l'exposé. La transparence résiduelle aux Infra-Rouges dans les cas d'intoxications chroniques et professionnelles rend la tâche très difficile.

Nous avons nous-mêmes repris ce travail et nous renvoyons pour ce sujet à la 4ème partie, où nous exposerons les cas observés et les hypothèses que l'on est amené à émettre.

Dans l'état actuel des choses, il semble peu probable, que des investigations ultérieures sur l'absorption dans le proche infra-rouge des pigments sanguins permettent un dosage précis de faibles quantités de CO.

Dans l'état actuel de nos recherches, il semble qu'en cas d'opacité à l'Infra-Rouge, on ne puisse conclure qu'à l'absence d'intoxication récente. Mais le phénomène de transparence à l'Infra-Rouge du sang intoxiqué chronique laisse envisager le problème sous un nouvel aspect, d'un très grand intérêt.

TROISIEME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

PRINCIPE - APPAREILS UTILISES -

EVALUATION THEORIQUE DE LA COURBE D'ETALONNAGE.

Si nous nous reportons aux courbes (fig.11, page 21) représentant les variations des densités optiques d'une solution d'oxyhémoglobine, et de la même solution saturée de CO, pour les longueurs d'onde correspondant à la bande d'absorption α , on observe un maximum d'absorption à 5770 Å pour la solution de HbO₂, et un autre à 5700 Å pour la solution de HbCO. On remarque que l'absorption est plus faible avec cette dernière. D'autre part, les courbes d'absorption de mélanges en proportions variables de HbO₂ et HbCO se situent entre les deux courbes précédentes ; leurs maximum se situent eux-mêmes entre les deux maximum de HbO₂ et HbCO purs, et sont d'autant plus rapprochés de 5700 Å que la teneur du mélange est plus forte en HbCO.

Cette remarque avait été le point de départ de la méthode spectrophotométrique de BALTHAZARD ², et nous avons vu qu'elle avait donné lieu à une détermination rapide mais imprécise du coefficient d'empoisonnement.

Sous l'impulsion de M. Guillet, nous avons pensé substituer à cette mesure visuelle spectrophotométrique un enregistrement microphotométrique qui permettrait d'explorer cette portion du spectre intéressante, dans ses détails les plus fins, et donnerait ainsi des mesures plus précises.

Paragraphe 1 - DESCRIPTION DES APPAREILS.

Il s'agissait donc d'abord de photographier des spectres de solutions et de les enregistrer ensuite au microphotomètre. Nous disposions pour cela :

1 - D'un petit spectrographe à prisme. (pour effet Raman) de la Maison Huet donnant des spectres, dans le visible, d'environ 8 cm. de long sur 6 mm. de haut. Le porte-plaque contenant la plaque photographique à impressionner est situé verticalement dans un chassis mobile. Ce dernier peut être déplacé verticalement, au moyen d'une vis, d'une distance totale de 6 cm., de sorte qu'il est possible de photographier sur la même plaque, 7 spectres différents. D'autre part, devant la fente F d'ouverture du Spectrographe est interposé un volet mobile percé de 3 trous carrés de 1 mm.5 de côté, situés à trois hauteurs différentes ; on peut ainsi diviser le spectre initial en 3 portions égales. On peut donc photographier, en réalité, sur la même plaque $7 \times 3 = 21$ spectres différents.

Avec ce spectrographe 1 mm sur un cliché, dans la région qui nous intéresse correspond environ à 50 Å. Nous verrons par la suite que nos mesures devant s'effectuer sur une distance totale de 70 Å à 1 Å près, nous devons utiliser au mieux le pouvoir séparateur du spectrographe, et travailler avec une ouverture de fente F la plus faible possible, soit $2/100^{\circ}$ de millimètre.

2 - D'un Microphotomètre Enregistreur de type Moll (Modèle A), construit par la firme KIPP et ZONNEN [49]. Pour la bonne compréhension des manipulations décrites ultérieurement nous reproduisons ici le schéma de son système optique.

La source lumineuse est un filament incandescent spiralé à axe rectiligne d'une petite lampe K alimentée par une batterie d'accumulateurs de 6 volts, de grande capacité. Le courant nécessaire est de 4 ampères environ, et peut d'ailleurs être réglé à l'aide d'un rhéostat monté dans le socle de l'appareil. Le condenseur C_1 projette sur une fente réglable S_1 l'image de ce filament. Le faisceau est ensuite concentré par la lentille

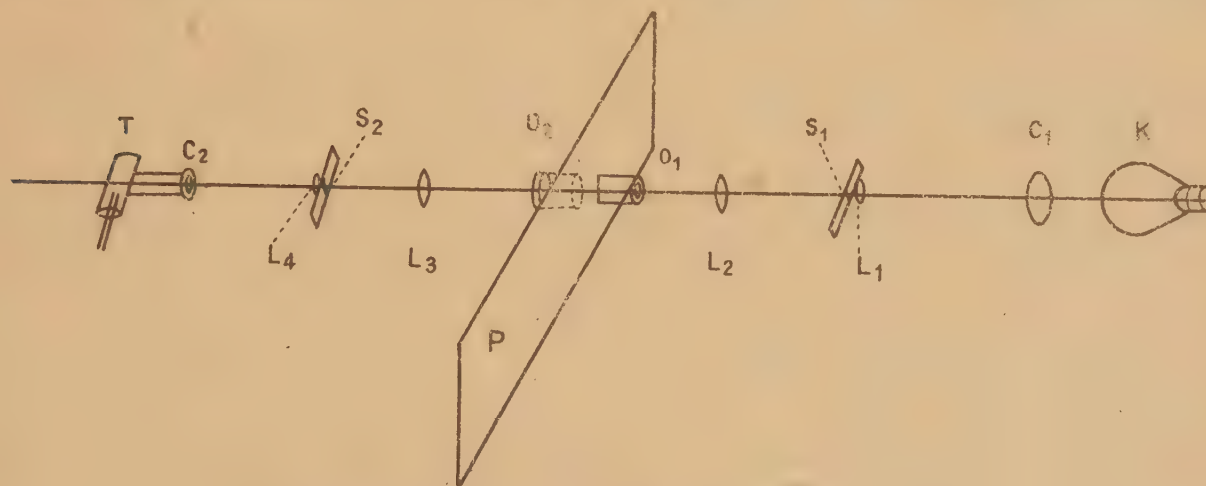


Schéma du montage optique du microphotomètre

Fig.22

L_1 sur l'objectif O_1 , lequel forme sur la plaque photographique P une image réduite de la fente S_1 . Cette image formée sur la plaque est agrandie par l'objectif O_2 et projetée sur la fente réglable S_2 . La lumière traversant cette fente S_2 est ensuite concentrée par la lentille L_4 sur le condenseur C_2 qui forme une image réduite de la fente S_2 sur un couple thermo-électrique dans le vide T , relié à un galvanomètre Moll à cadre mobile, dont les déviations sont enregistrées photographiquement sur une feuille de papier au bromure enroulée sur un tambour.

La plaque photographique fixée sur un porte-plaque est montée sur un chariot mobile actionné par un moteur qui donne en même temps au tambour enregistreur un mouvement circulaire. Il y a une proportionnalité parfaite entre le déplacement horizontal de la plaque et la rotation du

tambour. Le porte-plaque peut lui-même subir sur le chariot un déplacement vertical de 5 cm, qui permet l'enregistrement successif de plusieurs spectres pris sur la même plaque.

Deux engrenages différents sont montés sur l'arbre principal actionnant le tambour, et permettent des vitesses relatives différentes. On pourra avoir, soit un déplacement de 1 mm. de la plaque correspondant à environ 50 mm. de la périphérie du tambour (rapport 1/50), soit un déplacement de 1 mm. correspondant à environ 4 mm. de la périphérie du tambour (rapport 1/4). C'est la première vitesse que nous utiliserons.

L'enregistrement photographique des déviations du galvanomètre se fait comme suit: Une chambre photographique (boîte de métal cylindrique étanche à la lumière) contient le tambour cylindrique autour duquel on tend une feuille de papier au bromure (12 x 40 cm). La chambre est munie d'une lentille cylindrique horizontale, parallèle à l'axe du tambour. Le miroir du galvanomètre projette sur cette lentille un trait lumineux vertical. La lentille condense la lumière de ce trait en un point lumineux sur le papier. Un volet couvre la lentille.

Pour contrôler les mouvements du spot avant et pendant l'enregistrement, une échelle graduée (12 cm de longueur) est fixée sur le volet et une seconde au-dessus de la lentille.

A l'extrémité extérieure de l'axe du tambour est fixée une aiguille qui permet à l'opérateur de contrôler le mouvement du tambour. Celui-ci peut d'ailleurs être tourné à la main, après avoir été désaccouplé.

Un dispositif optique spécial permet l'inscription sur le papier du tambour, en même temps que de la courbe, d'un quadrillage régulier qui facilite les repérages.

Le montage optique du microphotomètre permet donc l'exploration de la plaque photographique par un pinceau lumineux très étroit et donne à l'appareil un grand pouvoir résolvant. En utilisant des fentes d'environ 0,03 mm. de largeur il est possible de résoudre complètement un système de deux lignes noires nettement définies dont la distance est moindre que 0,005 mm. Les possibilités dues au pouvoir résolvant de cet appareil sont donc bien supérieures à celles qui nous sont offertes par le spectrographe dont nous disposons.

Paragraphe 2 - EVALUATION THEORIQUE DE LA COURBE-ETALON.

Il est possible d'établir par le calcul une courbe théorique indiquant la valeur du déplacement du maximum de la bande d'absorption pour une certaine teneur en carboxyhémoglobine. En effet, pour une longueur d'onde donnée, et pour un mélange en proportions variables de solution de HbO_2 - HbCO , les densités optiques de ces solutions interviennent suivant le rapport des parties composantes $\left(\frac{\text{HbO}_2}{\text{HbCO}}\right)$ du mélange.

On peut donc, connaissant les densités optiques de solutions de HbO_2 et HbCO pures, pour des longueurs d'onde échelonnées, calculer les densités optiques de mélanges en quantité croissante de HbCO , et tirer de là les longueurs d'onde correspondant aux densités optiques maximum, c'est-à-dire au maximum d'absorption.

Nous nous sommes rapportés aux valeurs indiquées par H.S. NEWCOMER [65] (J. Biol. Chem.) (1919), traduisant les densités optiques de solutions de HbO_2 et HbCO contenant 0 g. 76 % d'hémoglobine, mesurés sous 1 cm. d'épaisseur, pour des longueurs d'onde comprises entre 5690 Å et 5790 Å ; et nous avons calculé une série de valeurs intermédiaires pour un certain nombre de pourcentages en HbCO ; ce qui nous a conduit au tableau suivant :

(Voir tableau page suivante)

Sur le tableau, sont soulignées, pour chaque pourcentage, les densités optiques maximum, situant la position du maximum d'absorption pour ce pourcentage. Si l'on porte en abscisses les % de HbCO et en ordonnées les valeurs décroissantes des densités on obtient la courbe suivante :

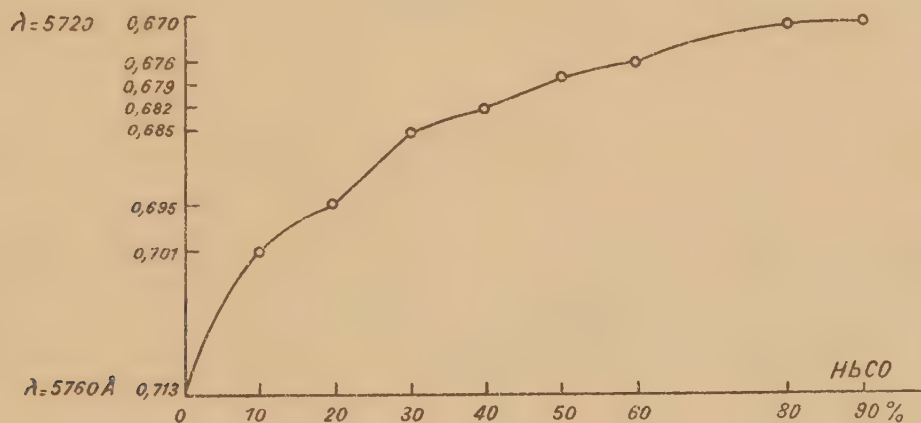


Fig. 23

En réalité cette courbe calculée s'écarte quelque peu des valeurs expérimentales pour plusieurs raisons. Elle ne prévoit pas, par exemple, la présence de l'hémoglobine réduite qui existe toujours pratiquement en très faible quantité dans le sang. Et surtout, nous ne pouvons accorder qu'un crédit assez limité aux valeurs des densités optiques auxquelles nous nous sommes rapportés pour l'établissement de cette courbe, étant donné les précautions insuffisantes, prises par l'auteur dans la préparation des solutions d'oxy- et carboxyhémoglobine (nous verrons plus loin quelles sont les conditions de mesures plus rigoureuses).

Nous avons donc préféré établir expérimentalement cette courbe-étalon de base. BALTHAZARD [2] l'avait d'ailleurs fait aussi pour mettre au point sa méthode ; nous reproduisons ici quelques valeurs obtenues par cet auteur :

	0°	10°	20°	30°	40°	50°	60°	80°	90°	100°
5.690 Å	0,5	0,517	0,534	0,551	0,568	0,585	0,602	0,637	0,653	0,671
5.700 "	0,545	0,558	0,571	0,583	0,597	0,610	0,623	0,649	0,662	<u>0,675</u>
5.720	0,655	0,656	0,658	0,660	0,661	0,663	0,664	0,667	<u>0,670</u>	0,671
5.730	0,695	0,691	0,689	<u>0,685</u>	<u>0,682</u>	<u>0,679</u>	<u>0,676</u>	<u>0,670</u>	0,667	0,664
5.740	0,708	<u>0,701</u>	<u>0,695</u>	0,678	0,682	0,676	0,670	0,667	0,651	0,645
5.760	<u>0,713</u>	0,699	0,685	0,671	0,657	0,644	0,630	0,602	0,588	0,575
5.770	0,712	0,693	0,675	0,657	0,640	0,622	0,603	0,568	0,550	0,533
5.790	0,665	0,642	0,621	0,599	0,583	0,555	0,543	0,489	0,467	0,445

Tableau des densités optiques de solutions (HbO₂-HbCO) en quantités croissantes de HbCO (solution à 0,76 % de Hb sous 1 cm).

Longueurs d'onde (en Å)
du maximum d'intensité
de la bande de gauche α

Coefficient
d'empoisonnement

5770	0,00
5765	0,10
5760	0,23
5755	0,27
5750	0,32
5745	0,37
5740	0,43
5735	0,48
5730	0,53
5720	0,66
5710	0,78
5700	1,00

Balthazard notait en même temps la difficulté qu'il y avait, dans ce cas, à obtenir des dilutions sanguines à concentration constante en HbO_2 et HbCO . En effet la saturation totale par CO d'une solution de HbO_2 est difficile à obtenir, et d'autre part les mélanges de solutions de HbO_2 et HbCO réalisés "in vitro" ne sont pas stables. Il fallait donc faire la mesure immédiatement le mélange réalisé.

EMPLOI DES CUVES A FACES PARALLELES.

Nous avons eu recours à l'artifice suivant : au lieu de chercher à réaliser deux solutions l'hémoglobine de même concentration, l'une totalement saturée de CO, l'autre d'oxygène, pour les mélanges, ensuite en proportions variables et photographier chaque fois le spectre d'absorption du mélange, nous avons utilisé deux séries de cuves à faces parallèles, la première série contenant la solution pure de HbCO , l'autre série la solution pure de HbO_2 .

Nous avons ensuite photographié les spectres d'absorption correspondant tous à la même épaisseur totale de liquide, mais à des épaisseurs variant en raison inverse de chacun d'entre eux. Ainsi aucun mélange des solutions n'est réalisé, et on est certain de la proportion réelle de HbCO qui intervient dans l'absorption.

Deux séries de huit cuves d'épaisseurs intérieures croissantes, allant de 1 mm à 50 mm. nous permettaient d'obtenir des combinaisons équivalant à des mélanges croissants en HbCO . On a pu établir une courbe-étalon avec beaucoup plus de sûreté que par le procédé de Balthazard.

Cuves		Epaisseurs en millimètres	Largeur à mi-hauteur
Série HbO ₂	Série HbCO		
n° 1	1'	1	22 mm.
2	2'	2	"
3	3'	2	"
4	4'	5	"
5	5'	10	"
6	6'	20	"
7	7'	30	"
8	8'	50	"

Les combinaisons réalisables sont les suivantes :

								Taux de HbCO %.
HbCO								0
HbO ₂	1	2	2	5	10	30	50	
HbCO	1							
HbO ₂		2	2	5	10	30	50	
HbCO		2						
HbO ₂	1		2	5	10	30	50	2
HbCO	1	2						
HbO ₂		2	5	10	30	50		
HbCO	1							3
HbO ₂		2	5	10	30	50		

etc...

elles permettent, si on le désire, d'obtenir l'équivalent de solutions d'épaisseur totale égale à 100 mm. et de concentration variant de 0 à 100 % de HbCO, par unités.

L'interposition d'une ou plusieurs cuves d'une série avec les cuves correspondantes de l'autre série donne ainsi automatiquement un pourcentage défini et fixe en HbCO.

D'autre part la manipulation est facilitée et rapide.

En possession de ces moyens techniques, le problème se posait donc ainsi :

1 - Etudier un montage optique qui permet d'obtenir un spectre dans les meilleures conditions. Soit, former sur la fente F du spectrographe, faiblement ouverte, un faisceau lumineux idéal.

2 - Choisir des plaques photographiques adéquates, et chercher au microphotomètre l'enregistrement donnant les courbes de densité les plus lisibles.

3 - Opérer avec des solutions à taux constant en Hb et préparer ces solutions dans les meilleures conditions.

4 - Etalonner définitivement la courbe donnant le taux de HbCO en fonction du déplacement du maximum d'absorption, en prenant comme référence, les radiations émises par l'arc au Mercure.

5 - Vérifier les résultats obtenus et tester la méthode comparative-ment à des méthodes éprouvées.

CHAPITRE DEUXIEME

MISE AU POINT DE LA METHODE

Paragraphe 1 - MONTAGE OPTIQUE.

Du point de vue optique, il nous fallait obtenir sur la fente F du spectrographe un éclairement aussi homogène que possible, et assez fort pour opérer avec une fente très fermée. Puisque l'épaisseur de la solution à traverser (soit les 8 cuves) était de 117 mm., nous devions utiliser au mieux le faisceau lumineux. Des essais préliminaires ayant pour but de fixer la concentration d'hémoglobine des solutions, d'étudier les temps de pose, essayer les plaques etc... furent entrepris avec un montage optique précaire ; nous ne disposions d'ailleurs au départ que d'un matériel limité

a - Premier montage Optique.

La source lumineuse dont nous disposions alors était une lampe de 125 watts à plusieurs filaments, alimentée sous 110 volts, placée dans un châssis laissant passer un faisceau lumineux divergent par un orifice circulaire de 4 cm. de diamètre. Une partie de ce faisceau était reçue à 60 cm. de la source par un prisme à réflexion totale qui renvoyait le faisceau sur une lentille cylindrique convergente de distance focale $f = 22$ cm.

La lentille formait image de la source sur la première cuve à faces parallèles. Les 8 cuves étaient placées dans le prolongement des rayons lumineux, en contact les unes avec les autres, celles de plus faibles épaisseurs vers le prisme, les plus épaisses vers la fente du spectrographe. Elles étaient posées sur un socle amovible à hauteur de la fente du spectrographe.

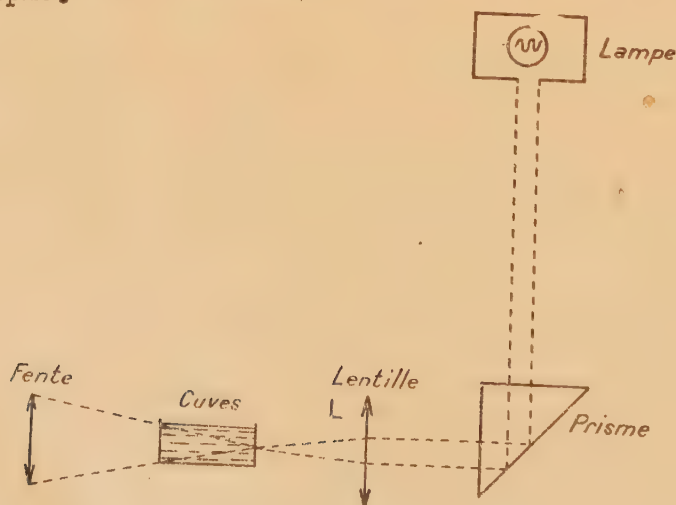


Schéma du 1^{er} montage optique

Fig. 24

Les solutions préparées comme nous verrons plus loin étaient versées dans les cuves et plusieurs séries de spectres pouvaient être photographiés sur la même plaque (Plaque Gevachrome 32 6x13 cm.).

Nous avons vu, comment, grâce au volet interposé devant la fente du spectrographe, nous pouvions prendre $7 \times 3 = 21$ clichés sur la même plaque.

Des essais variés furent faits ayant pour but de choisir une ouverture de la fente F en bonne relation avec les temps de pose, et le taux d'hémoglobine des solutions à examiner.

Ce montage rapide s'est avéré immédiatement insuffisant, et la nécessité d'opérer dans des conditions strictement identiques aussi bien pour la position des cuves que pour les concentrations en Hb des solutions nous a amenés à fixer les jeux de cuves dans une enclave fabriquée dans ce but.

b - Deuxième Montage Optique.

En effet nous avons vérifié, en interposant sur le trajet lumineux les jeux de cuves seulement remplies d'eau distillée, que suivant les positions relatives des cuves entre elles, les raies de la lumière monochromatique du Mercure ne se présentaient pas aux longueurs d'onde fixes ($\lambda = 5461 \text{ \AA}$, $5790 \text{ \AA}$ etc...) mais semblaient osciller de quelques Angstroms autour de ces valeurs.

Cet effet provient du non-parallélisme rigoureux des faces des cuves. Elles sont en réalité prismatiques, comme on le vérifie aisément au fronto-focomètre. Il est nécessaire de faire préalablement le contrôle de ce parallélisme. On rejette les cuves trop défectueuses, et on dispose les autres dans un ordre tel que l'ensemble de la file de cuves se comporte comme une lame à face parallèle (rayon de sortie dans le prolongement du rayon d'entrée sous incidence normale).

D'où la nécessité de numéroter les cuves, de les employer toujours dans le même ordre, et de les fixer dans une sorte de gouttière ainsi conçue :

La longueur totale des jeux de cuves étant 117 m/m, nous avons construit une gouttière en laiton à deux côtés mobiles (l'un longitudinal, l'autre transversal)

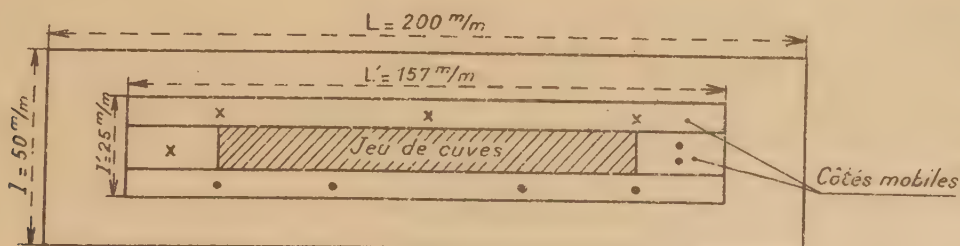


Fig.25

Deux côtés perpendiculaires l'un sur l'autre, sont fixés au moyen de vis à une règle en laiton (200 x 50 m/m); les deux autres perpendiculaires également l'un sur l'autre sont amovibles (l'un dans le sens de la longueur, l'autre dans le sens de la largeur) de 16 m/m environ ; ils permettent d'ajuster très exactement les jeux de cuves qui se trouvent bloquées.

La règle est elle-même fixée sur un socle parallélépipédique en contre-plaqué. Ce socle une fois le jeu de cuves réglé dans le sens du faisceau était ensuite fixé à la table.

Des essais grossiers d'établissement d'une courbe-étalon furent entrepris avec ce système, mais sans succès. Nous avons incriminé alors plusieurs facteurs tels que le manque de sensibilité des plaques, la préparation défectueuse des solutions, l'effet possible de substances réductrices du gaz d'éclairage etc... et nous avons constaté que la principale cause d'erreur n'était pas là. Après enregistrement au microphotomètre des spectres d'absorption, nous constatons bien un déplacement du maximum variant grosso-modo comme la teneur en HbCO des solutions envisagées, mais pas strictement proportionnel à cette teneur. Et surtout la distance maximum entre HbCO 100 % et HbO_2 100 % varie au cours de chaque expérience

Nous avons voulu voir si, en formant l'image de la source sur la fente même du spectrographe on obtiendrait un meilleur éclaircissement.

Pour cela, on change la position de la source et du système lentille-prisme-cuves par rapport à la fente F du spectrographe et nous avons amené l'image à se former sur la fente ouverte à 3/100 de mm. (Cuves contre la fente même). On gagnait ainsi en intensité lumineuse, mais en même temps on constatait un éclaircissement irrégulier de la fente. L'image formée était constituée par des portions éclairées différemment, espacées chacune de 5/10 de m/m environ. D'ailleurs par le seul mouvement circulaire d'une ou deux cuves sur elles-mêmes dans la gouttière, la fente était éclairée irrégulièrement ; on retrouvait au développement de la photo, avec des temps de pose et de développement identiques, des différences d'impression importantes.

Nous avons essayé de corriger ce défaut en plaçant la lampe dans une lanterne de projection munie à son entrée d'un verre dépoli, pensant homogénéiser ainsi l'image lumineuse. Avec ce dispositif, nous avons pris presque simultanément sur la même plaque, plusieurs spectres de HbO_2 puis dans les mêmes conditions de temps de pose, en interchangeant seulement la position des 8 cuves entre elles dans la gouttière.

Nous avons alors observé un déplacement du maximum d'absorption de HbO_2 important à droite et à gauche de la valeur 5770 Å, suivant l'ordre des cuves dans la gouttière. Ce déplacement provenait de ce que le faisceau lumineux entrant dans le spectrographe était incliné par rapport à l'axe de l'appareil. L'inclinaison pouvait provenir:

- a) Soit du non-parallélisme des faces des cuves, comme on l'a déjà vu;
- b) soit du non-parallélisme du faisceau frappant la cuve ;
- c) soit d'une inclinaison de l'axe de ce faisceau par rapport à l'axe du spectrographe.

Il fallait donc corriger ce défaut :

- D'abord par la compensation des déviations respectives dues aux cuves ; c'est ce que nous avons déjà essayé de réaliser.

- Ensuite par la construction d'un banc d'optique qui nous permit d'opérer en lumière strictement parallèle et convenablement axée.

c - Troisième montage : Construction du Banc d'Optique.

Nous avons été amenés alors au dispositif suivant : La source lumineuse (lampe de 250 watts à 10 filaments), placée dans une lanterne à projection est posée sur une table elle-même perpendiculaire à la table supportant le spectrographe.

Le Banc d'Optique de longueur totale 0m.64 comportait :

- A l'entrée un collimateur C_1 (15 cm x 4 cm de diamètre) terminé par une lentille convergente L_1 distribuant par l'interposition d'un diaphragme immobile un faisceau de lumière parallèle de diamètre à peine inférieur au diamètre des cuves. (La source lumineuse est en effet située au foyer de cette lentille L).

- Les cuves placées dans la gouttière en laiton, elle-même fixée sur le banc, sont traversées par le faisceau parallèle. A la sortie les rayons sont collectés par un second collimateur C_2 terminé par une autre lentille L_2 formant image de la source sur une fente réglable F' .

- Les trois parties (collimateurs C_1 et C_2 et les cuves) coulissent sur le banc d'optique.

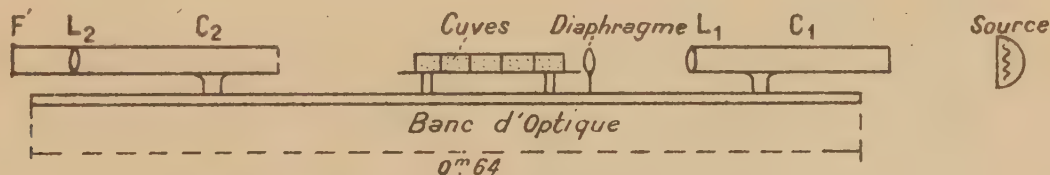


Fig.26 - Schéma du banc d'optique.

- Celui-ci est fixé sur un socle en bois construit à cet effet (au moyen de vis)

Longueur 100 cm.
largeur 8 cm.

Le réglage une fois terminé, le socle est fixé à la table. La lanterne repose sur un socle parallélépipédique également fixé à la table

$L = 36$ cm
 $l = 27,5$ cm
 $h = 17$ cm.

Les deux socles amènent évidemment source lumineuse, jeu de cuves, prisme et fente du spectrographe au même niveau.

- Le prisme réflecteur P reçoit alors un faisceau mince (≈ 5 mm. de large). La lentille cylindrique L reste interposée entre le prisme et la fente du spectrographe.

- Nous cherchions donc ainsi à former sur la fente F du spectrographe une image non plus de la source lumineuse (constituée en réalité par la superposition des images des nombreux filaments), mais l'image de la fente F' réglable et aussi mince que possible.

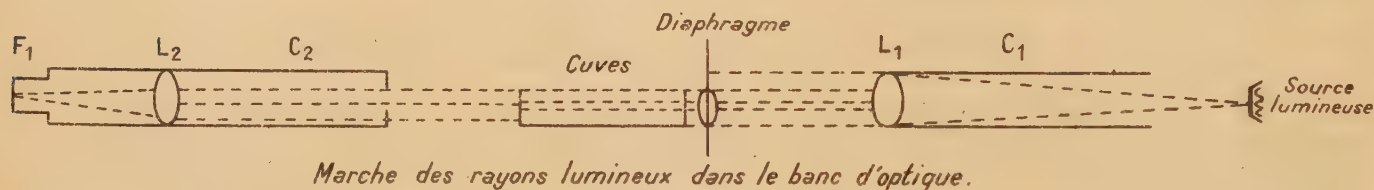


Fig. 27

Mais nous perdions en même temps une grande partie de l'intensité lumineuse, et en respectant l'ouverture étroite de la fente F du spectrographe, on voyait sur le spectre apparaître plusieurs défauts, dont quelques lignes longitudinales et mobiles d'ailleurs, se déplaçant dans toute la hauteur du spectre.

Ces raies observées dans le spectre, lorsque l'intensité lumineuse est faible, sont dues aux grains de poussière fixés sur les bords de la fente du spectrographe. Elles disparaissent avec un fort éclaircissement et avec une grande ouverture de la fente. Le meilleur moyen pour les supprimer en partie quand la fente est fine consiste à fermer la fente sur une feuille de papier Joseph ou de papier à cigarette en ayant soin de ne pas déchirer ce papier le long de la fente, ce qui aurait pour résultat de laisser davantage de débris cellulosiques. Néanmoins il est difficile de les supprimer complètement.

La présence des impuretés nous gênait puisque nous devions opérer avec une ouverture de $3/100$ de mm. (inscrite sur le tambour; en réalité $3/100$ marqués correspondent à $2/100$ de mm. vrais). Il fallait donc les rendre négligeables par une meilleure utilisation du faisceau lumineux et l'obtention d'un spectre plus éclairé.

Nous supprimions alors sur le banc d'optique le deuxième système collimateur C₂, Lentille L₂ et fente réglable F'. D'autre part, la lampe de la lanterne, qui était en position verticale devenait horizontale. Nous supprimions également la lentille L interposée entre le prisme et le spectrographe pour la remplacer par un système de deux lentilles cylindriques convergentes ayant les propriétés suivantes :



- La première ℓ_1 , de distance focale $f = 30$ cm. recevait le faisceau réfléchi par le prisme P et donnait une image horizontale de la source (40mm x 4 mm). Au foyer de cette première lentille.

- Une deuxième ℓ_2 , cylindrique convergente, inversait l'image qui reprenait la position verticale et formait sur la fente du spectrographe un rectangle aux contours nettement délimités de 20 mm x 2 mm, c'est-à-dire couvrant très exactement la fente F du spectrographe.

On a ainsi réalisé la condensation de la plus grande partie du faisceau lumineux sur la surface d'ouverture du spectrographe.

Par la suite, au cours de nos mesures, il s'est avéré que le parallélisme rigoureux du faisceau lumineux n'était pas une qualité aussi exclusivement importante qu'on l'avait d'abord pensé. Nous verrons en effet que les écarts variables entre les maximum de HbO_2 et HbCO étaient imputables aussi à un mode de préparation défectueux des solutions.

On peut en réalité opérer dans des conditions optiques un peu moins strictes, en supprimant par exemple la lentille L_1 du premier colli-mateur. A condition de rapprocher le banc d'optique du prisme P et de si-tuer le jeu de cuves tout contre le diaphragme, on peut considérer le faisceau comme encore presque parallèle (à l'entrée des cuves : Diamètre du faisceau = 15 m/m - à la sortie des cuves : Diamètre du faisceau = 16 m/m) et le prisme reçoit ainsi la totalité des rayons.

Un écran noir est interposé autour du diaphragme et évite ainsi le passage de la lumière diffuse.

C'est dans ces conditions optiques que nous avons établi la courbe-étalon. Sur la table, supportant le spectrographe, les lentilles ℓ_1 et ℓ_2 , le prisme P, se trouve également une lampe à vapeur de Mercure (type Gallois), dont le faisceau lumineux peut être réfléchi par un autre prisme P' placé en arrière du premier. Pour éclairer la fente du spectro-graphe avec la lumière de l'arc au mercure, il suffit d'enlever le premier prisme P de sa logette construite à cet effet. On peut ainsi photographier au dessus des spectres à étudier, un spectre de référence du mercure.

Paragraphe 2 - OBTENTION DES COURBES D'ABSORPTION.

Etant donné le grand pouvoir résolvant du microphotomètre, nous étions certains à priori de pouvoir inspecter le spectre dans ses détails les plus fins. Nous cherchions à obtenir des courbes d'absorption dont la pente soit aussi forte que possible et le sommet aigu ; toutes conditions dépendant étroitement de la sensibilité de la plaque employée et du temps de pose.

a - Choix des Plaques Photographiques.

La transmission au sommet des courbes doit être pour HbO_2 environ de 50 % de la transmission totale de la plaque.

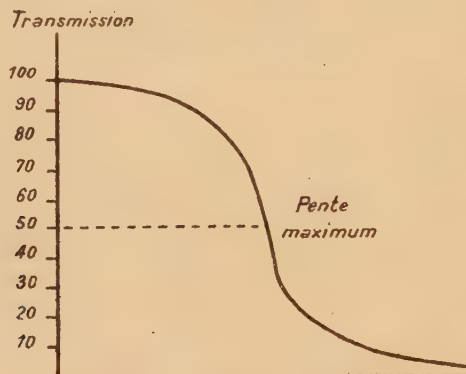
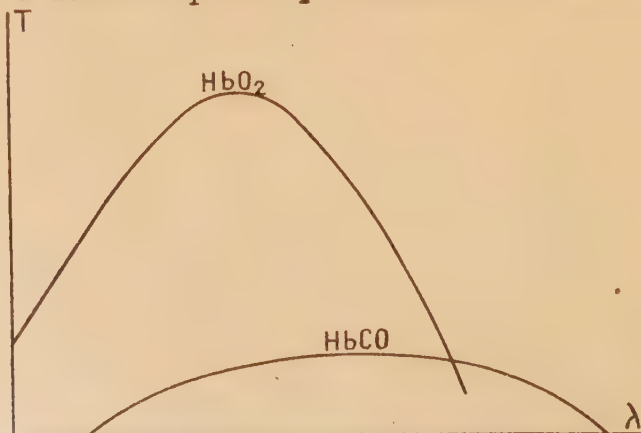


Fig. 28

Dans ces conditions, la pente est maximum et la sensibilité aussi grande que possible.

α - Nous avons fait les premiers essais relatifs aux concentrations en Hémoglobine avec les plaques orthochromatiques: Gevachrome 32 d'abord, puis Superchrome 32 (6x13 cm) (Gevaert) d'une sensibilité moyenne. Pour le taux de Hb employé (0,19 %/..), nous étions obligé d'ouvrir trop grand la fente du spectrographe (15/100 de mm). Et surtout la densité optique de HbCO étant plus faible que celle de HbO₂, nous obtenions après enregistrement au microphotomètre une courbe d'absorption convenable pour HbO₂, mais pour HbCO une courbe à sommet aplati qui rendait la détermination du maximum impossible.



Enregistrement de plaques - Gevachrome

Fig. 29

Pour égaliser on presque les opacités, on était obligé de faire varier le temps de pose et de le faire croître avec la teneur calculée en HbCO.

B - Après avoir incriminé l'inconstance de l'écart maximum entre les courbes d'absorption de HbO₂ et HbCO purs à certains facteurs, tels que la non saturation en CO des solutions de HbO₂, l'effet possible des substances réductrice du gaz d'éclairage etc... nous avons pensé au manque de sensibilité des plaques superchrome et nous nous sommes tourné vers des plaques présentant une sensibilité maximum dans les fortes longueurs d'onde:

Les Panchromatiques 66 Anti-halo - Guilleminot (6x13)

Il s'est avéré qu'avec ces plaques, pour une ouverture de la fente du spectrographe de 0,03 mm., le temps de pose optimum était de 15 secondes. Dans ces conditions on obtenait des enregistrements corrects tel que celui-ci :

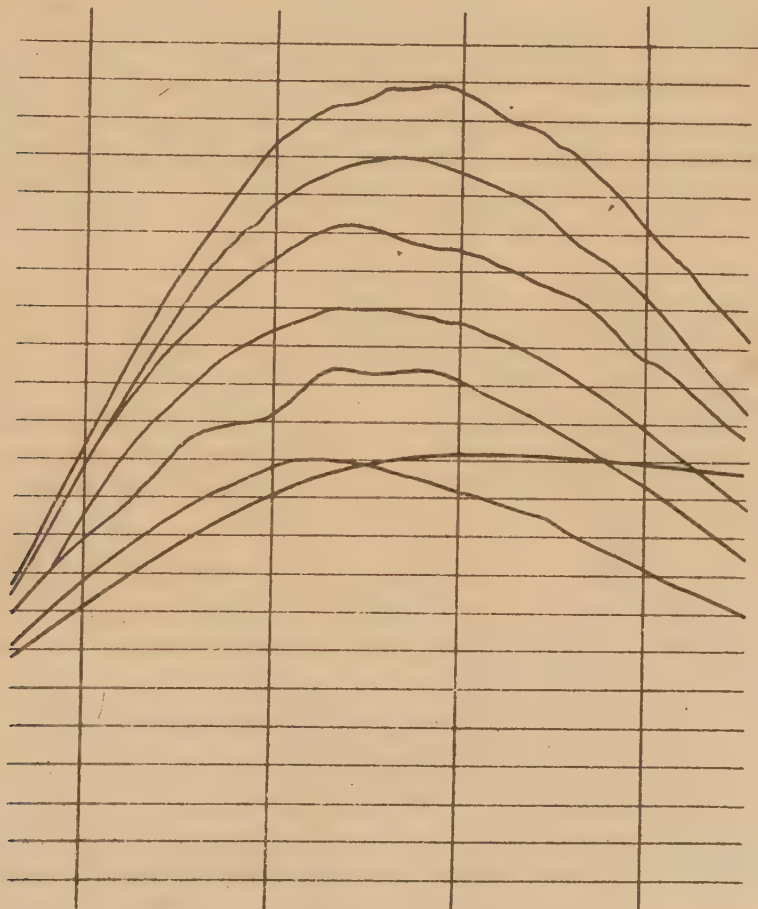


Fig. 30

Le révélateur employé avec ces plaques était le même que celui employé avec les Gevachromes :

Carbonate de sodium.....	30 g.
Sulfite de sodium.....	15 g.
Rhodol.....	3 g.
Hydroquinone.....	3 g.
Solution de BrK au 1/5.....	5 cc.
Eau q.s.p.	1000 cc.

Les Panchromatiques doivent être laissées 3 minutes au bain-révéléateur, en les agitant constamment. Le fixage se fait avec une solution d'hyposulfite de soude (15 minutes). Le développement doit se faire seulement avec une faible lumière verte (lampe Lumière). Les plaques sont rincées et séchées à l'air.

γ - Essais des plaques à fort contraste.

Dans le but d'augmenter la précision de nos mesures, nous avons pensé, par l'usage de plaques moins rapides, à fort contraste, obtenir des courbes à sommets aigus. (à pente maximum au sommet telle que 75 à 80 %.)

Nous avons essayé les plaques Kodak type IV.L. Emulsion n° 2116. A condition de poser assez longtemps, nous pouvions espérer en effet un départ brusque de la courbe aux environs de 5780 Å, tout en assurant un bon enregistrement (c'est-à-dire en maintenant au sommet une transmission approchée de 50 %). Malheureusement nous avons été obligé d'augmenter considérablement le temps de pose. Dans le cas contraire on obtient un départ de la courbe rapide, suivi bientôt d'un espace en palier, traduisant une impression insuffisante.

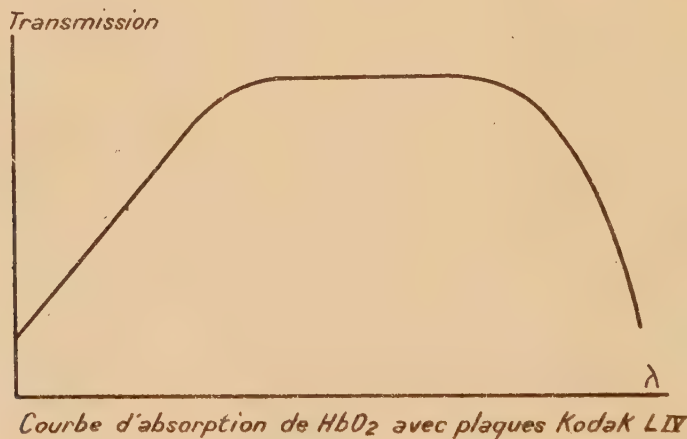


Fig. 31

Le révélateur employé avec ces plaques était le suivant :

Génol.....	3 g.
Sulfite de Na.....	45
Hydroquinone.....	12
CO_3Na_2	67,5
Bromure de K.....	2
Eau q.s.p.	1000 cc.

Le développement doit être de 4 minutes en cuvette à 18° dans le révélateur

- 5 sec. dans un bain d'arrêt (Acide Acétique à 13 %/..)

- 5 minutes dans le fixateur

{	Hyposulfite.....	60 g.
	Sulfite anhydre.....	15
	Acide acétique.....	13
	Alun.....	15
	Eau.....	q.s.pr. 1000

En opérant dans les mêmes conditions de concentration des solutions et d'Eclairement, nous avons été obligés de poser 30 minutes pour obtenir une courbe convenable, mais sans amélioration appréciable sur les Panchromatiques plus rapides. Le temps de pose beaucoup trop long nécessaire avec les plaques à fort contraste rend ces dernières inutilisables, sans peine d'enlever à la méthode un de ses avantages.

La courbe d'étalonnage fut établie avec les plaques Panchromatiques. Avec une ouverture de fente du spectrographe à 0,03 mm. et un temps de pose de 15 secondes on obtenait des spectres : de 50 mm x 6 mm. Les plaques étaient fortement impressionnées dans l'orangé et le jaune, et d'autant moins impressionnées qu'on se rapproche des faibles longueurs d'onde. Dans les conditions indiquées, la bande α d'absorption occupe une largeur approchée de 2,5 mm.

δ - Essai des Plaques "Kodak" 0,250

Avec des plaques orthochromatiques rapides, telles que les "Kodak Plates" 0.250 (6x9cm), on obtient également de bons résultats. La pente est aussi forte qu'avec les Panchromatiques. Elles présenteraient sur ces dernières l'avantage de fournir un tracé plus homogène ; les irrégularités dues à la grosseur du grain ne se faisant presque pas sentir ici. Toutefois on est obligé d'employer une solution au moins 2 fois plus concentrée en hémoglobine, et de poser 30 secondes au lieu de 15 secondes avec les Panchromatiques.

b - Enregistrement Microphotométrique.

Les conditions de l'enregistrement photographique doivent être bien définies, en particulier l'intensité du faisceau incident sur la plaque et les dimensions de ce pinceau lumineux. La plaque photographique placée sur le chariot mobile est fixée au porte-plaque par deux ressorts métalliques ; très exactement parallèle à ce chariot. Le spectre doit en effet se présenter perpendiculairement au pinceau lumineux. L'épaisseur des plaques restant toujours identique (1 mm.) il suffisait de régler une fois pour toutes l'emplacement des lentilles correctrices L_2 et L_3 (fig.22) pour que l'image de la fente S_1 se forme très exactement sur la face impressionnée de la plaque. De même par le déplacement de ces mêmes lentilles perpendiculairement à leur axe, on met en coincidence l'image de la fente S_1 et de la fente S_2 . Les fentes doivent être tournées de l'angle nécessaire

pour obtenir un parallélisme parfait entre celles-ci, les lentilles, la bande d'absorption à étudier.

Dans le cas contraire, l'image obtenue sur la plaque, au lieu d'être rectiligne et à contours définis, se présente comme un trait lumineux plus ou moins large suivant l'ouverture de la fente S_1 et entouré d'un halo de lumière diffuse qui fausse l'enregistrement.

α - L'Intensité du Faisceau ainsi que ses dimensions ont une grande importance.

En effet, utilisant comme source une lampe uni-filament d'intensité maximum et réglable de 4 ampères, alimentée par une batterie d'accumulateurs de 6 volts, nous avons cherché au début à obtenir sur la plaque un faisceau explorateur le plus fin possible, pensant mettre à profit le grand pouvoir résolvant du microphotomètre. La lampe était alors utilisée à pleine intensité (4 ampères) et les fentes S_1 et S_2 étaient ouvertes à 0,05 mm.

En réalité les courbes d'absorption enregistrées par le spot lumineux ne donnent pas satisfaction dans ce cas, elles sont hachurées à l'extrême. Sur le papier enregistreur, sont reproduites toutes les aspérités du grain de la plaque. Et il est très difficile ensuite, reprenant le tracé au crayon par exemple, d'établir une courbe moyenne, et par le fait de trouver le vrai maximum d'absorption.

A plus forte raison la réduction dans le sens de la hauteur du pinceau lumineux, facilement réalisable par la position de deux diaphragmes en V coulissant devant les fentes S_1 et S_2 , n'est pas souhaitable :

1' - Nous avons vu que par l'augmentation de l'éclairement de la fente du spectrographe nous avons supprimé dans le spectre certaines raies dues aux impuretés des bords de la fente. Mais il en subsiste toujours quelques-unes. D'ailleurs même si elles ne sont pas visibles à l'oeil nu, la photo sur la plaque les révèle souvent. Or au cours de la spectrographie, ces poussières peuvent changer de place le long de la fente, ce qui entraîne également un déplacement des raies dans la hauteur du spectre. Si donc on écalerait la plaque avec un pinceau trop étroit on risquerait d'éclairer sur une même plaque contenant plusieurs spectres tantôt une portion contenant une raie, tantôt une autre n'en contenant pas, tantôt une autre en contenant plusieurs etc..., ce qui entraînerait une différence de transmission importante.

2' - La légère courbure des spectres fait que l'on doit photométrer au centre du spectre, et toujours à la même hauteur.

β - Le spot lumineux du Galvanomètre défile sur une règle graduée fixée sur le tambour enregistreur, sur une longueur totale de 12 cm. Il faut donc régler l'intensité incidente (au moyen du Rhéostat) pour trouver l'élongation maximum.

Dans les expériences relatives à l'établissement de la courbe-étalon, il nous fallait enregistrer sur le même papier des valeurs très voisines (0, 3, 5, 8, 12 etc... % en $HbCO$). Les densités optiques correspondantes à ces pourcentages varient peu. Et nous devons pour éviter toute

confusion entre les courbes tracées, maintenir un décalage raisonnable entre elles. Le simple réglage de l'intensité incidente nous y conduisait et nous pouvions par exemple utiliser une gamme d'intensités telle que celle-ci :

4 ampères, 3,8 amp., 3,6 amp., 3,5 amp.

qui se traduisait sur le papier enregistreur par une différence approximative de

0 cm.5 pour 1/10 d'ampère.

D'ailleurs dès que nous atteignons les pourcentages élevés en HbCO, le déplacement naturel du maximum vers les faibles longueurs d'onde nous dispensait de faire varier l'intensité incidente.

Nous avons pensé, un instant, à l'influence possible de la variation de l'intensité incidente sur le déplacement du maximum d'absorption. Il nous a suffi pour vérifier que cette hypothèse n'était pas fondée, de photométrer plusieurs spectres sur le même cliché comme précédemment mais cette fois en conservant une intensité constante (4 ampères), et en faisant varier au contraire la sensibilité du galvanomètre.

γ - Enregistrement Mécanique des Clichés.

Pendant les essais, nous prenions en général 7 clichés sur la même plaque. L'enregistrement photométrique se faisait sur papier au Bromure Guillemot Riviera n°1 (dimensions : 12 x 40 cm). Ce papier est irrétrécissable. Sur une même feuille on pouvait prendre 2 x 7 = 14 courbes d'absorption (soit 2 plaques) sans risques d'interférences entre les courbes d'absorption, à condition d'opérer comme il a été dit plus haut.

Le papier est fixé dans le tambour enregistreur, en évitant toute lumière blanche (seule une lampe rouge de faible intensité est autorisée). Le tambour tourne à faible vitesse soit :

1 mm. de la plaque correspondant à environ 50 m/m de la périphérie du tambour (1/50).

La longueur totale du papier au bromure (40 cm) correspond donc à 0,8 cm. de la plaque.

En même temps que l'enregistrement de la courbe d'absorption, nous inscrivions sur le papier un quadrillage permettant par la suite une mesure plus facile. Le microphotomètre était réglé ainsi :

{	Lignes de distance.....	0 mm.1
	Eclairage des lignes de distance.....	+ 5
	" des Divisions Millimétriques...	∞
	Lanterne du Galvanomètre.....	Maximum
	Ouvertures des fentes S_1 et S_2	1/10 de m/m

Lorsque nous obtenions sur le même papier plusieurs enregistrements, nous pouvions, grâce à la fidélité remarquable du système de quadrillage (lignes

de distance, division millimétrique), nous dispenser de conserver l'éclairage des lignes de distance et des divisions millimétriques après 2 enregistrements de courbe. Dans le cas contraire, en effet, le papier aurait été trop impressionné par rapport à la courbe d'absorption.

Pour l'enregistrement proprement dit, le système optique étant réglé une fois pour toutes et les caractéristiques du microphotomètre respectées, la plaque était fixée sur le porte-plaque, la face impressionnée vers la source lumineuse, très parallèlement au chariot. Le chariot étant déconnecté, on amenait celui-ci en position telle que le pinceau lumineux tomba en avant de la bande α , aux environs de $\lambda = 5500 \text{ \AA}$. On amenait en même temps le tambour enregistreur au zéro (la flèche extérieure solidaire du tambour l'indique). L'appareil était connecté ensuite et l'enregistrement mécanique effectué. Pour passer d'un spectre à un autre sur le même cliché il suffisait de ramener à la main le chariot à sa position initiale (ce qui est facile par repérage de la flèche du tambour). Une vis permettant au chariot un mouvement de translation très exactement vertical, nous poursuivions les enregistrements ainsi en partant toujours de la même longueur d'onde.

c - Formes des courbes d'absorption obtenues et détermination du maximum.

Pour déterminer le maximum d'une courbe d'absorption sur le tracé il fallait d'abord régulariser à l'aide d'un crayon dur taillé très fin les aspérités de la courbe ; aspérités d'autant moins nombreuses que les conditions d'enregistrement sont mieux étudiées. Nous avons vu l'influence de la dimension et de l'intensité lumineuse de l'image de la fente sur cet effet.



Fig. 32

A signaler, à ce propos, l'utilité de laver soigneusement les plaques photographiques pour supprimer toute impureté qui se colmaterait sur le cliché et qui se traduirait sur la courbe d'absorption par des irrégularités d'autant plus gênantes qu'elles se produiraient au sommet de la courbe (fig. 32).

Le papier enregistreur une fois révélé (Révélateur D 154 Kodak), fixé (hyposulfite de Na), lavé et séché, on reprend une par une les courbes

à l'aide d'un crayon. Plusieurs procédés peuvent être utilisés pour la détermination du maximum:

α - Dans un premier cas, on trace les tangentes à la courbe en deux points situés à même hauteur des deux côtés de cette courbe. Du point de croisement des tangentes on abaisse la perpendiculaire aux lignes horizontales millimétriques. Le point de rencontre de cette perpendiculaire avec la courbe donne le maximum d'absorption. Plus exactement il se rapproche d'autant plus du maximum que la hauteur des points de tangence augmente.

β - On peut également, au lieu de tracer les tangentes, tracer deux sécantes à la courbes à partir de 4 points situés deux à deux à la même hauteur de la courbe.

γ - Enfin, et c'est le procédé le plus précis, on peut, en se rapprochant le plus possible du sommet, prendre la moyenne arithmétique d'une série de 4 à 5 valeurs, donnant l'équidistance de points situés à égale hauteur de part et d'autre de la courbe.

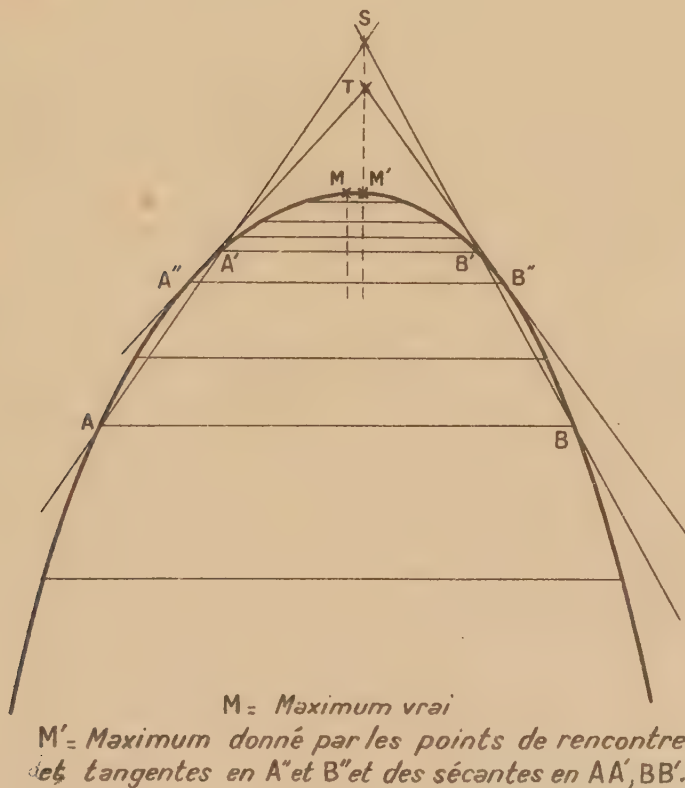


Fig. 33

Avec les deux premiers procédés, en effet, on introduit une erreur d'autant plus grande que la différence de la pente des deux portions de la courbe est plus grande. Il faut donc dans ce cas faire une correction et calculer un déplacement supplémentaire à la valeur trouvée.

Le troisième procédé revient au contraire à négliger la différence de pente, à condition évidemment de faire les mesures moyennes dans la

partie haute de la courbe. Si on s'écarte du sommet de la courbe, on voit que en prenant des valeurs moyennes et en extrapolant, on arrive cependant à retrouver le maximum vrai.

L'expérience nous a montré que par ce procédé, on arrivait à fixer le maximum à 1 m/m près sur le tracé. Etant donné que l'écart maximum observé entre les courbes de HbO_2 et HbCO au sommet est de 72 m/m, comme nous le verrons, on peut donc grosso modo estimer la précision de la mesure à $1/72 = 1,39 \text{ } \%$. ~~=~~ 1,4 % en HbCO . Ce sera la limite approximative de précision de la méthode.

Paragraphe 3 - LES SOLUTIONS D'OXY- et CARBOXY-HEMOGLOBINE.

Les solutions d'oxy- et carboxy-hémoglobine doivent être préparées avec beaucoup de soin. Le mode de préparation appliqué dans les essais préliminaires s'est montré défectueux, nous verrons quelles en étaient les causes.

a - Détermination du taux de Hb des solutions de HbO_2 .

Des essais spectrographiques préliminaires furent effectués ayant pour but de choisir une concentration en Hb optimum pour l'épaisseur de solution traversée par le faisceau lumineux incident. Nous avons décrit ci-dessus le montage optique employé à cet effet. Le sang était recueilli sur FNa à 3 %., et Hb dosé par la méthode optique de DOGNON 24.

Dosage de Hb.-

On utilisait comme source lumineuse la lumière monochromatique de l'arc au mercure filtré sur un écran n° 62 Wratten laissant passer 10 % de la radiation verte : 5461 Å et 0,05 % des radiations jaunes 5769,5 Å et 5790 Å. On opère donc pratiquement avec la radiation 5461 Å. GUILLLOT et RENAULT 39 ont montré que pour cette longueur d'onde l'absorption est la même avec un sang complètement oxygénée, ou partiellement réduit, ou partiellement oxycarboné.

A l'aide de cette radiation on éclairait les cuves du colorimètre de Duboscq ; l'une des cuves était remplie de la dilution sanguine à 1 %., centrifugée 15 minutes à 5000 tours au préalable. Sous l'autre cuve remplie d'eau on plaçait un écran gris neutre étalonné de densité optique $D = 0,83$.

On déterminait l'épaisseur de la solution qui donnait l'égalité de teinte sur les deux plages du colorimètre. La concentration C en gr. %.. est donnée par la relation.

$$C \text{ } \%. = \frac{0,83 \times 100}{0,8 \times e}$$

0,8 = coefficient d'absorption de l'hémoglobine

e = épaisseur lue en centimètres au colorimètre.

GUILLOT et RENAULT [40] ont montré que cette méthode fournissait des résultats très précis, en bon accord avec les résultats donnés par les autres méthodes de dosage de Hb, à condition de respecter certains détails opératoires, tels que la centrifugation (15 minutes à 5000 tours) en la filtration de la dilution au 1/100 sur filtre Durieux bleu. Nous avons toujours utilisé la centrifugation. Faute de quoi, on obtient des dilutions plus ou moins troubles, et on perd une grande partie de la lumière par diffusion.

L'erreur est plus ou moins grande suivant le nombre de leucocytes sanguins, responsables en grande partie de cette diffusion, et peut atteindre d'après les auteurs de 10 à 30 et même 40 % dans certaines leucémies.

Nous avons constaté même avec des sangs de sujets non leucémiques des écarts de 7 à 10 % dans les mesures faites avant et après centrifugation. Cette opération était donc très importante dans nos expériences, puisque nous devions opérer toujours avec le même taux de Hb.

Taux de Hb employé.-

Disposant de la série de 8 cuves à faces parallèles placées bout à bout nous avons cherché la dilution optimum donnant un spectre net de HbO₂ et nous avons déterminé le taux en Hb de cette dilution par la méthode décrite ci-dessus. Cette concentration devait être en bon accord avec l'absorption spectrale, les temps de pose, l'intensité lumineuse etc...

Pour l'épaisseur traversée nous avons choisi une concentration :

$$C \text{ g } \% \dots = 0,19 \text{ en Hb.}$$

Au cours des essais ultérieurs, nous estimions la teneur en Hb (sur une dilution au 1/100 après centrifugation 15 minutes à 5000 tours) et nous amenions à la concentration de 0 g.19 %... par dilution à l'eau distillée. On avait ainsi une solution de HbO₂ prête pour l'emploi.

b - Solution de Carboxyhémoglobine.

Primitivement, nous préparions la solution de Carboxyhémoglobine de la façon suivante : la moitié de la solution de HbO₂ diluée au taux convenable servait à préparer la solution de HbCO. Nous faisons barboter le gaz d'éclairage dans cette solution, pendant 30 minutes en agitant constamment.

Mais la présence simultanée dans le gaz d'éclairage, à côté de l'oxyde de carbone, de divers gaz dont l'hydrogène, des carbures etc... nous fit penser à l'effet réducteur possible de ces gaz sur l'Oxyhémoglobine, ou à la formation en quantité appréciable de Méthémoglobine. C'est pourquoi nous avons par la suite préparé HbCO par action sur HbO₂ de CO pur, préparé à l'avance selon le procédé suivant :

Préparation de CO pur.-

CO était préparé par décomposition à chaud de l'Acide Formique à 90 % par SO₄H₂ pur qui agit comme déshydratant (NICLOUX 66)



La réaction se fait mieux à chaud. L'appareil générateur était constitué par un ballon B à tubulure latérale surmonté d'une ampoule à brome A. (fig. 34) La tubulure latérale T prolongée par un tube en verre coudé débouchant sous la cuve à eau, mettait en communication le ballon générateur de CO avec le récipient recueillant le gaz. Ce dernier était constitué par un grand flacon conique à large ouverture B'. IL était obstrué par un bouchon de caoutchouc traversé par un long tube effilé surmonté lui-même d'une allonge. Une tubulure latérale T' sur le flacon le mettait en communication avec l'air atmosphérique par un robinet R'.

Dans le ballon B on verse 15 cc. de HCOOH à 90 %.. Puis le robinet R étant fermé on verse dans l'ampoule A d'abord 60 cc. de SO_4H_2 . On ouvre peu à peu le robinet R. La réaction commence d'elle-même à froid. On place alors sur la cuve à eau un flacon rempli d'eau (1500cc.). On recueille la première portion de gaz pendant 8 minutes environ. (Cette opération ayant pour but de purger l'appareil et de le priver d'air). On enlève alors le flacon et on le remplace par le récipient récepteur de CO. On a pris soin au préalable de remplir d'eau le récipient ainsi que l'allonge. On renverse le tout sur la cuve à eau, et on recueille le gaz. On ajoute alors 60 cc. à nouveau de SO_4H_2 ; la réaction se ralentissant on chauffe très légèrement, en surveillant constamment. Le trop plein s'écoule par le robinet R' ouvert et CO monte dans l'allonge et dégage à l'extrémité

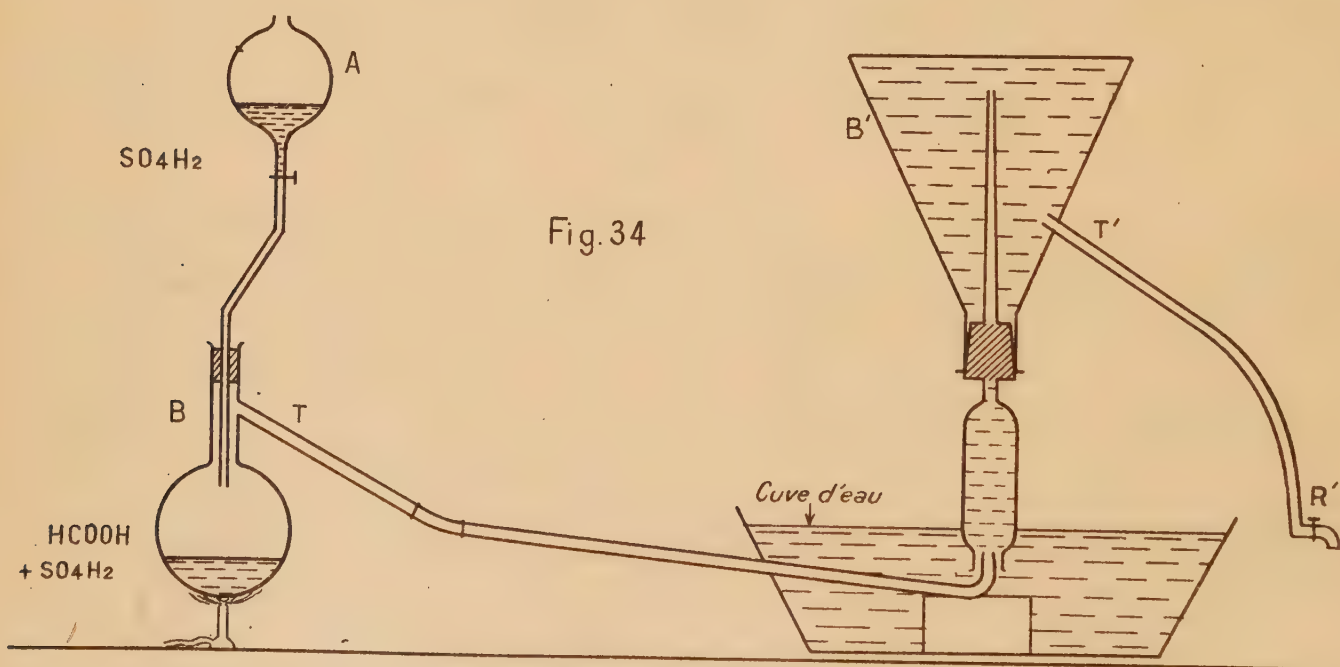


Schéma de l'appareil générateur de CO

du tube effilé. Quand le récipient est plein on ferme le robinet R' et on retourne le flacon conique surmonté de l'allonge pleine d'eau. Celle-ci est bouchée. Au fur et à mesure des prélèvements de CO on maintient la même quantité d'eau dans l'allonge. On a ainsi du CO pratiquement pur, et privé d'oxygène.

Préparation de HbCO.

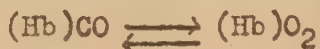
Pour préparer la solution de HbCO à partir du gaz on met le robinet R' en communication (par un tube de caoutchouc) avec un flacon laveur rempli de la solution préparée de HbO₂. On faisait barboter le gaz dans la solution (à raison d'une bulle toutes les 2 secondes) pendant 10 minutes. On obtenait une solution de HbCO aussi limpide que la solution de HbO₂ précédente et il était inutile de filtrer.

Les deux solutions (HbO₂ et HbCO) étaient maintenues en flacons bouchés tout le temps de l'expérience spectrographique.

c - Variations apportées dans la préparation des solutions.

Les améliorations apportées par le dernier système optique n'ayant pas été encore suffisantes, nous avons pensé qu'il fallait plutôt chercher dans les préparations des solutions elles-mêmes la principale cause d'erreur. Nous avons déjà dit que les solutions avaient été préparées jusqu'alors sans précautions spéciales : on hémolysait à l'eau distillée et amenait la dilution à concentration toujours identique, après avoir dosé Hb du sang recueilli sur FNa. La moitié de cette dilution servait ensuite à préparer HbCO.

Puisque les dilutions de HbO₂ et HbCO n'étaient pas mélangées (grâce aux jeux de cuves) on n'avait pas à craindre un échange "in vitro".



entre les gaz en excès dissous dans les solutions. Mais on pouvait penser à un déplacement de CO par O₂ atmosphérique, de par l'effet de la grande dilution et de la tension en O₂ de l'atmosphère, déplacement d'autant plus grand que l'expérience spectrographique durait plus longtemps. D'ailleurs le passage au spectrophotomètre de solutions de HbCO soi-disant saturées indiquait qu'elles ne contenaient souvent que 75, 80 ou 85 % de HbCO. D'autre part, les deux spectres de la même dilution, mais pris l'un aussitôt la préparation, l'autre 5 heures après ont donné, après passage au microphotomètre, des écarts maximum (entre les sommets de HbO₂ et HbCO) très différents :

Le premier : 69 m/m
Le second : 50 m/m

Nous avons alors changé le mode de préparation des solutions :

Les taux d'hémoglobine et de dilution une fois déterminés, on dilue avec de l'eau distillée préalablement bouillie et refroidie (privée d'air), on filtre rapidement au centrifuge. La solution est divisée en deux parties :

- La première est saturée par CO pur dans un flacon où l'on a fait le vide.

- La seconde est saturée d'oxygène (en faisant passer un courant d'air au moyen de la trompe à eau).

On soumet ensuite au vide les solutions pendant 5 minutes, temps suffisant pour enlever les excès de gaz CO et O₂ dissous et non combinés. Les dilutions sont portées ensuite dans les cuves qu'on recouvre de lamelles de verre qui assurent l'étanchéité. On procède alors à la spectrographie.

Nous avons fait ensuite l'expérience suivante :

Deux sortes de dilutions étaient préparées : l'une suivant l'ancien procédé, l'autre suivant le procédé décrit ci-dessus. On spectrographait dans l'heure suivante les deux dilutions pour des taux divers :

0, 20, 40, 80, 100 etc... % en HbCO.

On prenait en même temps le spectre de l'Arc au Mercure; et les spectres étaient ensuite microphotométrés. L'écart maximum observé entre les sommets d'absorption de HbO₂ et HbCO variait encore d'une dilution à l'autre. Mais cette fois, la courbe d'absorption de HbCO n'avait pas été déplacée vis-à-vis des raies immuables du spectre du Hg (5461 Å, 5770 Å, 5790 Å); c'était au contraire celle de HbO₂ qui s'était déplacée. Il ne fallait donc pas songer au déplacement de CO par O₂ (dans lequel cas la courbe d'absorption de HbO₂ serait restée immobile); il aurait été d'ailleurs étonnant que des différences aussi grandes aient pu être observées en un temps relativement court.

Nous ne pouvions pas non plus incriminer le manque de conservation des dilutions d'hémoglobine oxygénée, puisque les spectres étaient pris dans l'heure qui suivait la préparation des dilutions.

Nous nous sommes demandé alors jusqu'à quel point les spectres d'absorption de ces 2 pigments ne seraient pas soumis à l'influence des faibles modifications de pH. Les vapeurs acides nombreuses, émises dans le laboratoire de biochimie où nous travaillions pouvaient en effet être la cause de ces modifications.

d - Influence de l'Effet-Tampon.

Nous avons vérifié la dernière hypothèse par l'expérience suivante : nous avons utilisé une solution-tampon préparée comme suit : (Soerensen)

PO₄HNa₂ anhydre..... 57,76 gr.
PO₄H₂K..... 35,40 gr.
Eau distillée..... q.s.p. 1000 cc.

Cette solution est répartie en ampoules de 100 cc. On l'utilise à raison de 1/10 d'ampoule : 10 cc. pour 1000 cc.

son $p_H = 7$

Plusieurs sortes de dilutions ont été préparées :

Dilutions n° 1 : Tamponnées.

On ajoute 2 cc.5 de solution-tampon pour 250 cc. de dilution

sanguine préparée avec l'eau distillée bouillie et refroidie. La saturation par O_2 et CO est faite comme il a été dit précédemment. Les mêmes précautions sont prises pour enlever les excès de gaz non combinés (O_2 et CO).

Dilution n° 2

Une autre dilution est préparée avec le même sang en répétant toutes les opérations précédentes sauf l'addition de la solution-tampon.

Dilution n° 3

Une troisième dilution est préparée suivant l'ancien procédé (emploi d'eau distillée ordinaire, pas de solution-tampon).

Dilution n° 4

Enfin deux portions de 40 cc. de solution de HbO_2 sont additionnées l'une de 2 gouttes de CH_3COOH cristallisable, l'autre de 2 gouttes de $OHNH_4$.

On procédait alors à la spectrographie ; avec chacune des dilutions (1) (2) (3) on prenait des spectres de :

HbO_2 total

$HbCO$ total

$HbCO$ à 50 %.

les uns aussitôt après la préparation des dilutions, les autres 2 heures après.

Nous avons observé que l'écart des maximum d'absorption de HbO_2 et $HbCO$ donné par la dilution (1) était constant (72 m/m). Les spectres pris 2 heures après la préparation de cette dilution donnaient la même différence à 1 m/m près. Par contre, avec la dilution (2) l'écart qui était de 70 m/m pour le 1er spectre était tombé à 60 m/m au bout de 2 heures. Quant à la dilution (3) et aux solution légèrement acétiques et ammoniacales, elles donnaient des résultats tout à fait aberrants.

Nous avons recommencé cette expérience, avec les solutions-tampon en augmentant les délais de 2 heures à 2 heures.30, 3 heures et plus. Nous avons toujours trouvé un écart maximum allant de 71 à 73 m/m.

Nous avons ensuite voulu préciser l'ordre de grandeur des variations en fonction du pH proprement dit. Nous avons préparé une série de solutions-tampon.

Solution-tampon	Composition			P _H
	NaOH N/5	PO ₄ H ₂ K N/5	Eau	
n° 1	25 cc.	4 cc.30	q.s.p.100cc.	6,2
n° 2	"	6 cc.30	"	6,4
n° 3	"	8 cc.90	"	6,6
n° 4	"	14 cc.80	"	7,0
n° 5	"	19 cc.75	"	7,4
n° 6	"	21 cc.40	"	7,6
n° 7	"	22 cc.60	"	7,8

Avec la même dilution sanguine, nous avons ensuite préparé des solutions de HbO₂ et HbCO tamponnées à 2 % avec les solutions-tampon précédentes. Nous avons spectrographié sur la même plaque ces diverses dilutions 2 heures après leurs préparations.

L'enregistrement au microphotomètre de ces spectres a donné les écarts suivants, entre les maximum :

P _H	Ecart Maximum
7,0	71 m/m
7,4	73 m/m
7,6	73 m/m
7,8	76 m/m
6,2	66 m/m
6,4	66 m/m
6,6	68 m/m

D'après le tableau précédent, on voit que l'influence des variations de P_H sur les solutions préparées "in vitro" de HbO₂ n'est pas négligeable. Il y a lieu d'en tenir compte dans nos mesures.

Il n'est d'ailleurs pas surprenant que des substances protéiques, à gros poids moléculaire, manifestent leur fragilité sous l'effet de faibles variations, d'autant plus qu'elles se trouvent en solution très étendue. C'est ainsi, également, que nous avons remarqué une note de HARTRIDGE 44 (1912), relatant la modification apportée aux spectres des composés de l'hémoglobine sous l'influence de la température. D'après cet auteur, une différence de 1°C, sur une solution étendue (1/100) déplacerait le maximum de la bande d'absorption d'un composé hémoglobinique de 0,28 Å.

L'influence de la température n'est pas à redouter au cours de notre mesure si l'on prend soin de ne pas laisser longtemps les solutions sous l'incidence du faisceau lumineux. Mais si l'on en juge par les expé-

riences de Hartridge, une élévation de 10° suffirait pour obtenir un décalage de 2,8 Å.

Quant aux variations de température de la pièce qui renferme le spectrographe, elles sont au plus de 5°C , donc apportent une cause d'erreur de 1,4 Å, à peu près égale à celle de la méthode.

e) - Influence des Anticoagulants.

Recherchant les conditions idéales pour obtenir des courbes à sommets aigus, puisque les différents essais (temps de pose, ouverture en spectrographe etc...) n'avaient pas donné entière satisfaction, nous avons pensé à l'influence de la présence en quantité appréciable de Méthémoglobine. En effet, le fluorure de sodium sur lequel le sang était recueilli, empêcherait la transformation de la Méthémoglobine en hémoglobine oxygénée. Or il existerait toujours 3 % environ de MéthHb sans le sang. Nous avons été amenés ainsi à étudier l'influence des anticoagulants.

Nous avons fait les mêmes essais avec

α - Du sang défibriné à l'aide de billes de verres.

β - Du sang recueilli sur FNa à 1 %/..., 2 %/..., 3 %/...

- " " " " Oxalate de Na à 1 %/..., 2 %/..., 3 %/...

- " " " " Liquide " " "

- " " " " Citrate de Na " " "

- Nous n'avons pas observé de différences dans la forme des courbes obtenues.

Quant à l'écart maximum entre les maximum d'absorption de HbO_2 et HbCO , il était variable suivant les cas ; mais nous avons vu précédemment quelle en était la cause véritable.

Paragraphe 4 - ETALONNAGE DE LA METHODE.

Les conditions opératoires étant précisées, il restait à étalonner la méthode d'une façon définitive. Nous avons vu que l'utilisation des deux jeux de cuves constituait un avantage majeur, toutes les gammes étant permises. Plusieurs séries de combinaisons furent utilisées ; en voici quelques-unes :

% en HbCO	{	0	2,5	8	25	50	100
		0	4	6	16	66	100
		0	5	10	33	83	100
		0	3	5	8	30	100
		0	2	12	20	40	100
		0	10	20	50	75	100

Chaque combinaison fut reprise au moins 5 fois. Nous nous sommes attaché surtout à déterminer point par point la courbe pour les faibles valeurs (de 0 à 20 % en HbCO). Entre 20 et 50 % en HbCO, nous déterminions les valeurs de 3 en 3. Au-dessus de 50 % de 5 en 5 environ. Les valeurs supérieures à 83 % n'ont pas été fixées expérimentalement, puisque ne présentant aucun intérêt pratique.

En même temps que les spectres de chaque gamme, nous photographions le spectre de l'arc au mercure donné par une lampe à vapeur de Mercure (type Hawitt) dont les raies principales émises sont :

$$\begin{aligned} \text{dans le jaune} & : \begin{cases} \lambda = 5769,5 \text{ \AA} \\ \lambda = 5790,5 \text{ \AA} \end{cases} \\ \text{dans le vert} & : \lambda = 5461 \text{ \AA} \\ \text{dans le violet} & : \lambda = 4538,6 \text{ \AA} \end{aligned}$$

La raie $\lambda = 5769,5 \text{ \AA}$ nous sert de référence. Puisqu'elle est distante seulement de $0,5 \text{ \AA}$ du maximum d'absorption de HbO₂ ($5770 \text{ \AA}$) on peut dans notre mesure, confondre ces deux maximum ($0,5 \text{ \AA}$ est en effet inférieur à la précision de nos mesures $\neq 1 \text{ \AA}$).

Sur la même plaque on prend donc 6 spectres de solution (HbO₂-HbCO) et le spectre de Hg. Pour ce dernier, il suffit d'enlever de sa logette le prisme P réflecteur du faisceau de lumière blanche; on remplace cette dernière par la lumière monochromatique réfléchiée par le prisme P'. Le temps de pose est de 15 secondes pour l'ouverture de la fente utilisée.

Il faut prendre soin de laver assez souvent les cuves du Pulfrich au cours de l'opération d'étalonnage. Le lavage à l'alcool ne suffit pas pour les dégraisser. Nous utilisons le mélange sulfo-chromique :

$$\begin{cases} \text{Cr}_2\text{O}_4\text{K}_2 \text{ à } 10 \% \text{ dans Eau} \dots\dots\dots 1 \text{ Volume} \\ \text{SO}_4\text{H}_2 \text{ pur concentré} \dots\dots\dots 1/2 \text{ Volume} \end{cases}$$

Les distances mesurées en millimètres à partir de $\lambda = 5769,5 \text{ \AA}$ étaient rapportées pour chaque valeur sur un papier millimétrique. Nous avons ainsi en prenant la moyenne de chaque valeur (déterminée 5 fois) établi une courbe moyenne donnant le déplacement millimétrique du maximum d'absorption en fonction du coefficient d'empoisonnement. La distance maximum entre les 2 sommets (HbO₂ et HbCO) est de 72 m/m.

C'est la valeur moyenne trouvée, à 1 m/m près, (valeurs extrêmes 71 et 73 m/m) dans toutes les gammes. Puisque la distance séparant les 2 maximum d'absorption est de $70 \text{ \AA}$, on peut dire que un déplacement de 1 \AA correspond à 1,02 m/m soit $\neq 1 \text{ m/m}$.

On peut donc confondre la distance millimétrique et la distance en longueurs d'onde.

Voici les déplacements moyens (sur 5 déterminations) observés pour un certain nombre de valeurs en HbCO %.

Déplacements mesurés en m/m (à partir de $\lambda = 5770 \text{ \AA}$)	HbCO %.	Déplacements mesurés en m/m (à partir de $\lambda = 5770 \text{ \AA}$)	HbCO %.
0	0	13	20
2,5	2	15	25
3	2,5	17,5	30
3,5	3	19,5	33
4,5	4	21	35
6	5	25	40
6,5	6	33	50
8	8	45,5	66
9	10	52,5	75
10	12	58,5	83
11	15	72	100

Ci-contre la courbe étalon tracée d'après les points expérimentaux.

(Voir figure 35 page suivante)

Nous remarquons d'après cette courbe que pour les valeurs allant de 0 à 12 % en HbCO, la pente est telle que le déplacement est environ de 1 m/m pour 1 % en HbCO. Entre 12 et 30 % au contraire la pente diminue, pour redevenir ensuite plus forte. Entre les valeurs de 12 à 30 % on a donc une diminution de sensibilité.

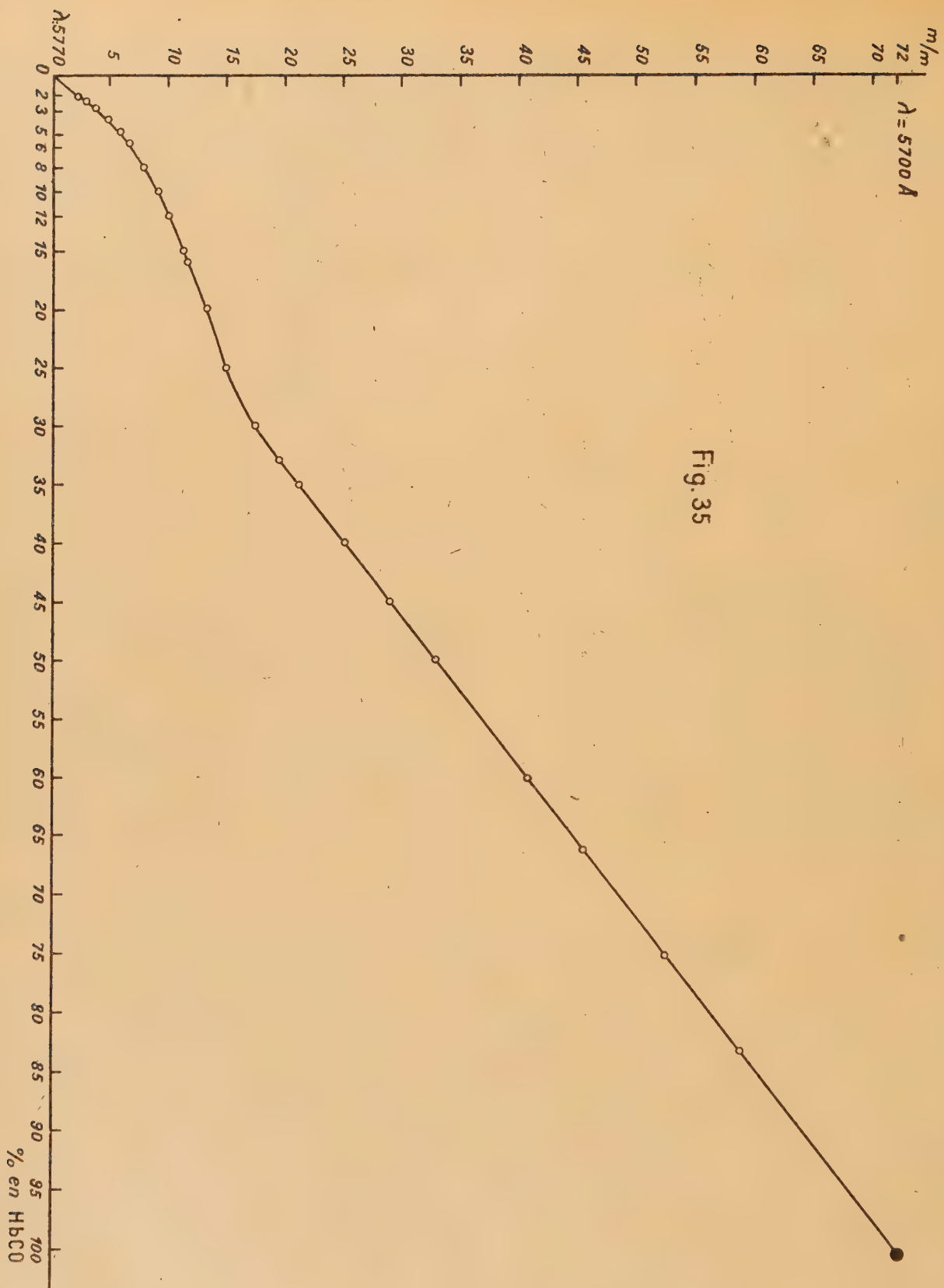
Si nous nous reportons aux valeurs données par BALTHAZARD 2, et définies expérimentalement par cet auteur, nous constatons également un départ de la courbe rapide, pour les faibles valeurs, puis une pente plus faible ensuite. Mais pour Balthazard, la diminution de la pente ne commence qu'aux environs de

$$\lambda = 5760 \text{ \AA} ,$$

soit pour un coefficient approché de 0,23. En effet, entre 5770 Å et 5760 Å, se situeraient les coefficients d'empoisonnement allant de 0 à 0,23.

Nous voyons, d'après notre courbe, qu'en réalité, c'est-à partir du coefficient 0,12 que la pente, donc la sensibilité diminue.

Quant à la courbe théorique, nous ne sommes pas surpris de voir qu'elle est très loin du résultat expérimental, puisque nous savons que les chiffres qui ont permis de l'établir étaient sujets à critique.



CHAPITRE TROISIEME

TECHNIQUE

Pour la technique de dosage, on effectuera la mesure dans une cuve à faces parallèles de 1 cm. d'épaisseur et 25 cc. de capacité.

Paragraphe 1 - PRELEVEMENT.

On recueille le sang (1 cc.) par ponction de la veine du pli du coude, ou par piqûre au doigt ou au lobe de l'oreille, dans un petit tube à hémolyse où l'on a mis préalablement des traces de FNa. On bouche hermétiquement le flacon, et agite. Le dosage doit être fait aussi rapidement que possible. Dans le cas contraire on doit maintenir l'échantillon dans un endroit frais ($< 10^{\circ}\text{C}$).

Paragraphe 2 - DOSAGE DE Hb.

Il faut déterminer d'abord la "Capacité Respiratoire" de l'individu ; pour cela on dose Hb selon la méthode optique de Dognon ²³ ²⁴ (Nous renvoyons plus haut, pour la description en détail de cette technique). On opère sur une dilution au 1/100 (0cc.25 de sang dilués dans 25cc. d'eau distillée). Il est indispensable comme nous l'avons dit plus haut, de filtrer ou mieux de centrifuger 15 minutes à 5000 tours ; l'omission de cette précaution entraînant des erreurs notables. Nous avons vu également que pour la longueur d'onde utilisée ($\lambda = 5461 \text{ \AA}$), l'absorption est pratiquement identique pour une solution pure de HbO_2 , et pour une solution partiellement oxycarbonée.

La concentration du sang à étudier en Hb est donné par la formule

$$C = \frac{D \times 100}{0,8 \times e}$$

D = densité optique de l'écran gris utilisé

0,8 = Constante d'absorption de Hb

e = épaisseur en centimètres lue au colorimètre.

Paragraphe 3 - DOSAGE DE LA CARBOXYHEMOGLOBINE.

1 - Dilution.

La concentration optimum pour le dosage de HbCO est de

2 g.32 %/.. en Hb

(on a en effet pour ce taux, et examiné sous 1 cm. d'épaisseur, la même densité optique qu'avec l'épaisseur des cuves ayant servi à l'étalonnage).

Sachant qu'il faut au minimum 25 cc. de dilution, ou bien on calcule, d'après le taux de Hb déterminé précédemment, la quantité de sang à diluer dans 25 cc. d'eau, ou bien on prélève 0 cc.50 de sang qu'on amène à dilution convenable. (L'eau distillée doit être préalablement bouillie et refroidie).

- On ajoute à cette dilution 1 % de la solution-tampon (Soerensen) ($pH = 7$)

PO_4HNa_2 anhydre.....	57 g.46
PO_4H_2K	35 g.46
Eau distillée.....q.s.p.	1000 cc.

On agite et dès que l'hémolyse est faite au centrifuge 10 minutes à 5000 tours. On place la dilution centrifugée dans la cuve à faces parallèles de 25 cc. et 1 cm. d'épaisseur, qui est immédiatement placée sur le trajet du faisceau de lumière blanche sur le banc d'optique, immédiatement derrière le diaphragme.

2 - Spectrographie.

Pendant la centrifugation, on charge le porte-plaque, à l'obscurité, avec une plaque Panchromatique 66 anti-halo (6 x 13) (Guilleminot), la face à impressionner vers le volet d'ouverture. On introduit le porte-plaque dans le châssis du spectrographe :

- L'ouverture de la fente du spectrographe est réglée à 0,02 m/m

- On pose 15 secondes très exactement.

On spectrographie ensuite l'Arc au Mercure. Pour cela on déplace verticalement le châssis contenant le porte-plaque d'une division. On retire de sa logette le prisme P réflecteur du faisceau de lumière blanche. On éteint la lampe de lumière blanche, et on allume la lampe à vapeur de Mercure; on pose 15 secondes également.

- On développe à l'obscurité 3 minutes dans le bain révélateur suivant:

Carbonate de soude sec.....	15 g.
Sulfite de soude anhydre.....	30 g.
Eau.....	1000 cc. dissoudre et ajouter
hydroquinone.....	3 g.
Rhodol.....	3 g.
Solution de bromure au 1/5.....	5 cc.

On rince à l'eau la plaque, et on fixe 15 minutes à température ordinaire (18°) dans une solution d'hyposulfite de soude. On rince à l'eau et on sèche la plaque.

Remarque - On peut également utiliser les plaques "Kodak 0,250" (6x9)

Dans ce cas, on doit :

- opérer avec une dilution de concentration double

4 g.64 %/.. en Hb.

- poser 30 secondes au lieu de 15 secondes (même ouverture de la fente du spectrographe)

- développer 4 minutes au bain-révélateur suivant

D 72 Kodak

{	Génol.....	15
	Sulfite de Na.....	45
	Hydroquinone.....	12
	Carbonate de soude.....	67,5
	Bromure.....	2
	Eau.....	q.s.p. 1000 cc.

- Fixer à l'hyposulfite de sodium, ou au fixateur tannant :

{	Eau.....	480
	Sulfite anhydre.....	90
	Acide acétique.....	78
	Alun.....	90

3 - Microphotométrie Manipulation au Microphotomètre.

On place la plaque sur le porte-plaque, parallèlement à celui-ci, la face impressionnée tournée vers la source lumineuse. On charge la chambre photographique contenant le tambour enregistreur d'une feuille de papier Guilleminot, Riviera n° 1 (10 x 42). On s'assure que la papier est bien adhérent au tambour et on l'immobilise par l'abaissement d'une petite tringle métallique placée à cet effet.

On allume la lampe du photomètre et règle à l'aide du Rhéostat l'intensité à 4 ampères. Pour le fonctionnement on respecte les caractéristiques suivantes :

Lignes de distance.....	0 mm.1
Eclairage des lignes de distance.....	+ 5
" " divisions millimétriques...	∞
Lanterne du Galvanomètre.....	Maximum
Ouverture des fentes S ₁	10/100 de mm.
" " " S ₂	10/100 de mm.
(marqués sur les petits tambours)	

Le tambour enregistreur tourne à faible vitesse (1/50).

- On actionne à la main la vis constituant l'arbre principal de l'appareil et on place le chariot (porte-plaque) de façon que le faisceau incident tombe légèrement en avant de la bande d'absorption à examiner (vers les petites longueurs d'onde, aux environs de $\lambda = 5500 \text{ \AA}$).

On amène la flèche indicatrice du tambour enregistreur au zéro de celui-ci. Par un premier déplacement à la main, on vérifie que le spot

lumineux du galvanomètre, ne sort pas du champ enregistreur. Puis on connecte l'appareil et on enregistre automatiquement la bande d'absorption. Après avoir débrayé l'appareil on ramène simultanément le tambour et la plaque à leur position primitive et on enregistre de la même façon la portion correspondante de la plaque qui contient le spectre de l'arc au mercure.

Remarque - 1 Il convient de photométrer toujours la même portion du spectre (et pour la bande d'absorption α et pour la raie du mercure) (pour éviter les erreurs dues à la légère courbure des spectres). On éclaire donc le milieu du spectre sur une hauteur égale au $1/3$ environ de la hauteur totale du spectre.

2 Si l'on a à faire plusieurs enregistrements sur la même plaque, il faut avoir soin de n'enregistrer que 2 fois les lignes de distance et les divisions millimétriques, faute de quoi on aurait une inégalité d'impression entre la courbe elle-même et les tracés millimétriques.

- On développe ensuite dans le Révéléateur (même formule que précédemment) 3 minutes (une lumière rouge est autorisée). On fixe au bain d'Hyposulfite de soude 10 minutes. On rince et on sèche.

- On mesure la distance comprise entre le maximum de la bande (λ 5769,5 A) du spectre du mercure et le maximum de la bande d'absorption du mélange HbO_2 - HbCO présumé. On a eu soin, pour cela, de régulariser le tracé de la courbe et de déterminer le maximum comme nous l'avons indiqué plus haut.

- En reportant sur la courbe-étalon cette distance mesurée on a directement le taux X de HbCO pour 100.

Paragraphe 4 - TAUX DE CO DANS LE SANG.

Etant donné que 1 gramme de Hb fixe indistinctement 1 cc.34 soit de CO gazeux soit de O_2 :

- Soit C = taux de Hb % trouvé précédemment.

On aura

$$\begin{array}{l} \text{CO} \\ \text{en centimètres cubes} \\ \text{pour 100 cc. de sang} \end{array} = \frac{X \times C \times 1,34}{100}$$

CHAPITRE QUATRIEME

RESULTATS OBTENUS - CONTROLE DE LA METHODE.

Nous avons contrôlé la méthode, en effectuant sur les mêmes échantillons, des dosages suivant la technique microphotométrique, et suivant les techniques de WOLFF [98], NICLOUX [69], et BALTHAZARD [2]. Nous avons exposé plus haut la technique de Wolff. Elle offre l'avantage de n'exiger qu'un matériel très réduit. L'auteur recommande de doser la Carboxyhémoglobine non détruite par photométrie. On peut également doser Hb, dans le filtrat, provenant uniquement de HbCO, selon la technique physique de Dognon, exposé plus haut. Nous savons en effet (GUILLOT et RENAULT [39]) qu'en opérant avec la radiation $\lambda = 5461 \text{ \AA}$ du Hg l'absorption est identique pour Hb - HbO₂ - HbCO. La technique de Wolff permet de déceler jusqu'à 1 % de HbCO, si l'on respecte strictement les conditions de pH et de température. Nous avons effectué de nombreux dosages par cette méthode ; il nous est arrivé à deux fois d'obtenir des résultats aberrants, que l'on doit imputer vraisemblablement à un manque de rigueur des conditions opératoires.

Nous avons adopté une méthode de Nicloux un peu modifiée ; en ce sens que l'extraction des gaz était bien effectuée dans l'appareil de Nicloux selon le procédé classique, mais nous absorbions ensuite CO par ClCu ammonia-cal, selon le procédé de TRUFFERT-KOHN-ABREST [50].

Voici rapportés dans le tableau suivant quelques résultats comparés obtenus avec des échantillons expérimentaux et avec des sangs pathologiques vrais :

.....

SANG n° 1

- 1) Teneur en hémoglobine..... 16 g.5 %.
- 2) Capacité Respiratoire..... 22,1 cc.

Méthode Spectrophotométrique		Méthode de Wolff		Méthode Microphotométrique	
Proportion de Carboxy-hémoglobine %.	CO pour 100 cc. de sang (cm ³)	Proportion de Carboxy-hémoglobine %.	CO pour 100 cc. de sang (cm ³)	Proportion de Carboxy-hémoglobine %.	CO pour 100 cc. de sang (cm ³)
12	2,57	12,5	2,68	12,5	2,68
20	4,29	19,5	4,31	21,2	4,54
30	6,43	30,5	6,74	28	6
62	13,7	60	13,26	60,5	13,27
100	22,1	100	22,1	102	22,5

SANG n° 2

- 1) Teneur en Hémoglobine..... 17 g.4 %.
- 2) Capacité Respiratoire..... 23 cc.31

Méthode de Wolff		Méthode Microphotométrique	
Proportion de Carboxyhémo-globine %.	CO pour 100 cc. de sang (cm ³)	Proportion de Carboxyhémo-globine %.	CO pour 100 cc. de sang (cm ³)
10,7	2,49	11	2,36
27,8	6,48	27,5	6,41
47	10,95	48	11,19
74,7	17,41	76,2	17,76
100	23,31	98,7	23,01

SANGS DIVERS

Méthode de Wolff		Méthode Microphotométrique		
	Proportion de Carboxy- hémoglobine p.100	CO pour 100 cc. de sang	Proportion de Carboxy- hémoglobine p.100	CO pour 100 cc. de sang
Teneur en Hémoglobine: 18,63 g.°/° Capacité Respiratoire 24,96 cc.	4	0,96	3,5	0,84
	12,1	3,16	12,5	3,02
	23,3	5,63	22	5,31
	43,7	10,9	43,7	10,9
	59,4	14,8	63,5	15,8
	100	24,9	102	25,4
Teneur en hémoglobine: 15 g.°/° Capacité Respiratoire 20 cc.l	4	0,80	3,5	0,68
	6	1,56	3,5	1,07
	17	3,31	18	3,51
	42	8,06	37,5	7,31
	62	12,09	65	12,67
	100	20,1	101	20,3

Sangs pathologiques	Teneur en hémoglobine g.°/°	Capacité Respiratoire	Méthode de Wolff	Méthode Microphotométrique	Méthode de Nicloux
N° 1...	14	18,7	1,91	1,96	1,86
N° 2...	15,2	20,3	1,40	1,17	1,32
N° 3...	14,8	19,8	0,50	0,75	0,40

CONCLUSIONS.

A l'examen des résultats précédents, nous voyons que la méthode proposée permet d'évaluer avec une excellente précision les taux de carboxy-hémoglobine supérieurs à 10 %., correspondant environ à un taux de 2,5 % (en volumes) d'oxyde de carbone dans le sang. Pour les taux inférieurs, les chiffres obtenus restent en bon accord avec ceux que fournit la méthode de Wolff, jusqu'à des valeurs de l'ordre de 3 % en HbCO (soit 0,75 cc. % de CO gazeux). Au-dessous de ce taux, il serait vain de vouloir faire une détermination précise. Néanmoins nous pensons que cette méthode peut rendre des services dans nombre d'intoxications chroniques même, où il n'est pas rare de trouver des carboxhémies de 2 à 4 % (en valeur de CO %.).

La méthode a l'intérêt d'apporter une vérification physique expérimentale directe à la technique de Wolff, devenue maintenant courante. D'autre part elle a l'avantage d'utiliser une très petite quantité de sang, tout comme la méthode spectrophotométrique de Balthazard, mais en permettant une plus grande précision que cette dernière, et un moyen d'investigation des faibles intoxications.

Son application est évidemment limitée du fait qu'elle exige un matériel coûteux ; mais dans le cas de certaines recherches, en particulier sur l'animal, où l'on doit faire de nombreuses déterminations, elle a l'avantage de se prêter aux dosages en série (nous avons vu qu'il était possible de faire plusieurs enregistrements photographiques et photométriques à la fois).

Notons enfin que c'est la seule méthode qui permette de présenter, du fait de son enregistrement photographique, une double pièce à conviction, (cliché spectrographique et enregistrement de la courbe) ce qui pourrait offrir un certain intérêt dans les expertises médico-légales.

QUATRIEME PARTIE

MESURES DE TRANSPARENCE DU SANG AUX RAYONS INFRA-ROUGES.

Dans la première partie de cette thèse nous avons vu que les propriétés particulières du spectre Infra-Rouge de la Carboxyhémoglobine avaient suscité de nombreuses recherches, tant en France (DUVOIR [25], TRUFFERT [94] etc...1939) qu'à l'étranger (WEINBACH [95], FROHLICH et RODENACHER [34], MERKELBACH [63], PERELLI [80] etc...). Après les premiers essais non concluants de Martha RIECKE [86] en 1936, seuls DUVOIR et TRUFFERT [28] pensèrent tirer de la différence d'absorption dans le proche Infra-Rouge de l'Oxyhémoglobine et de la Carboxyhémoglobine, un mode d'estimation quantitatif de HbCO. Un tel procédé présenterait en effet d'autant plus d'intérêt qu'il se rapporterait surtout à la fraction de Carboxyhémoglobine responsable de l'intoxication chronique.

En 1943, DUVOIR ET TRUFFERT [28], dans une publication, disaient: "Nous avons pensé à l'utilisation d'un photomètre à cellules photo-électriques sensibles à l'Infra-Rouge, mais il est indispensable de tenir compte des erreurs de diffusion qui viennent entacher les mesures photo-colorimétriques en milieu trouble. Il est possible d'éviter ces erreurs en utilisant le colorimètre intégrateur à sphère de Dognon et nous espérons à l'aide de cet appareil mettre au point une méthode de dosage de CO dans le sang, utilisant les radiations Infra-Rouges, et ayant une sensibilité supérieure à celles des propriétés spectroscopiques."

Nous n'avons pas trouvé, dans des publications ultérieures de ces auteurs, de notes ayant trait à la méthode promise.

Avec le concours de M. A. Berton, Chargé de Recherches au C.N.R.S.? nous avons voulu reprendre ce travail et étudier les possibilités de ce domaine.

CHAPITRE PREMIER

MONTAGE PHOTOMETRIQUE POUR INFRA-ROUGE

Nous avons conçu pour ces mesures un montage photométrique assez simple.

La source S, est une ampoule électrique à filament de tungstène alimentée par des accumulateurs de 6 volts de grande capacité. Elle possède donc une bonne constance d'intensité d'émission. La lumière, condensée au moyen de lentilles de verre, pénètre dans l'orifice d'entrée du détecteur d'Infra-Rouges.

Celui-ci est constitué par une pile thermo-électrique compensée de Volochine, reliée directement à un petit galvanomètre de Hilger N°41157/1 de résistance intérieure 40 ohms et extérieure 1000 ohms. Sa période est de 2 secondes.

Avec un tel récepteur, la déviation du spot produite par une bougie placée à 1 mètre de la pile thermo-électrique est de 5 m/m sur la règle graduée à 5 m. du galvanomètre.

Pour éliminer le rayonnement visible, nous utilisons un filtre Wratten 87 en matière plastique transmettant l'infra-rouge à partir de 7.350 Å. En réalité, il faudrait opérer au voisinage le plus proche possible de $\lambda = 8350 \text{ Å}$ (EGGERT [29]), longueur d'onde pour laquelle l'absorption est la même pour HbO₂ et Hb réduit. Mais comme Hb n'existe qu'en très faible proportion dans le sang normal, la cause d'erreur introduite est négligeable dans nos mesures approchées. (Dans le cas d'un mode de dosage précis, il en aurait été autrement).

Le sang, laqué et préparé selon un procédé décrit antérieurement, était contenu, dans les premières expériences, dans une cuve à faces parallèles du photomètre de Pulfrich (épaisseur 1 cm); par la suite, dans une cuve démontable en verre du type de la figure 37.

Les transmissions pour cent sont calculées par rapport à la transmission de l'eau dans une cuve de même épaisseur et dans des conditions identiques.

$$\frac{I_{\text{sang}} \times 100}{I_{\text{eau}}} = T \text{ \%}$$

Les élongations du galvanomètre sont proportionnelles aux éclairagements du couple. Si on pose :

E_{sang} : Elongation correspondant au sang

E_{eau} : " " " à l'eau

$T \text{ \%}$: Transmission %.

PHOTOMÈTRE POUR L'INFRAROUGE.

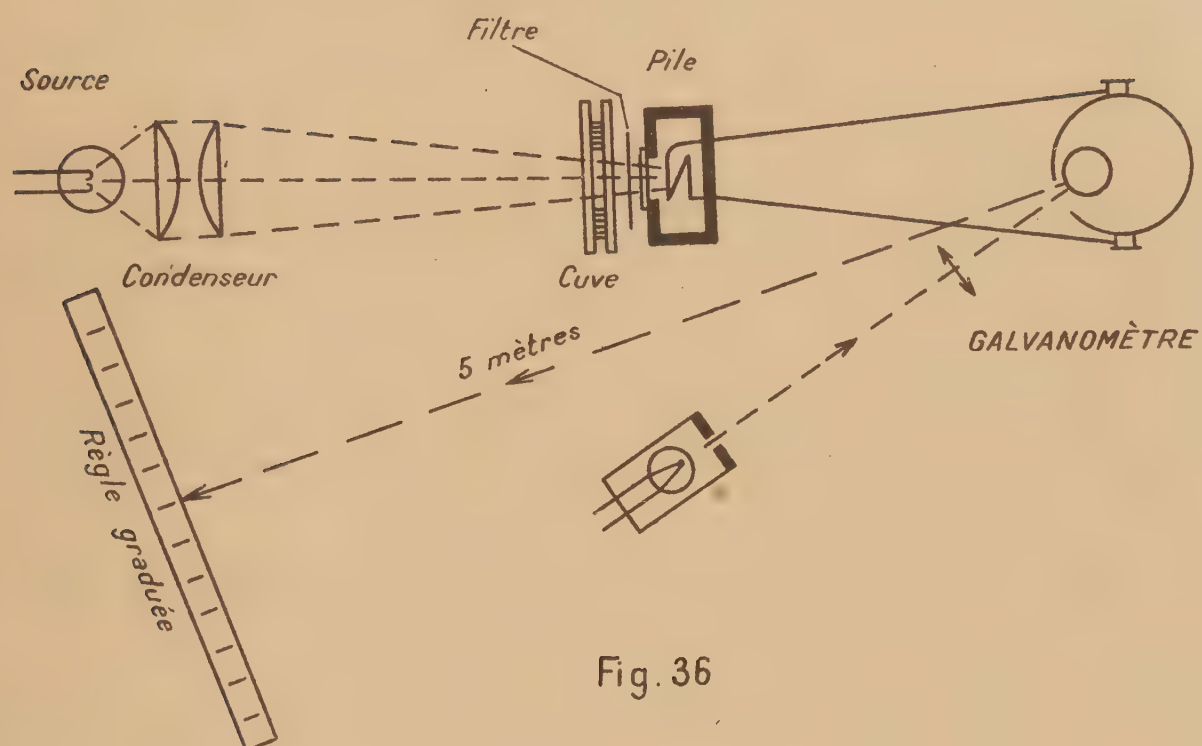


Fig. 36

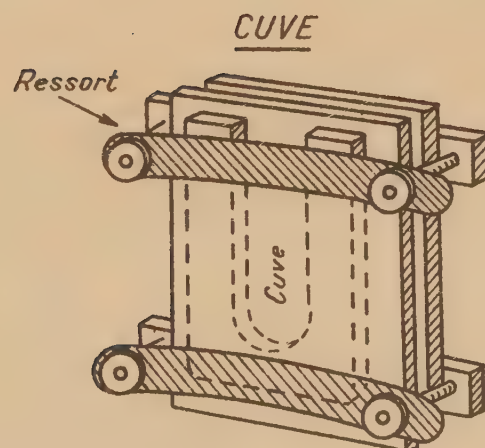


Fig. 37

L'absorption correspondante sera :

$$\frac{(E_{\text{eau}} - E_{\text{sang}}) \times 100}{E_{\text{eau}}} = A \text{ \%}$$

CHAPITRE DEUXIEME

HYPOTHESE DE L'INFLUENCE DE LA DIFFUSION DANS LE PHENOMENE.

Dans les expériences décrites par les divers auteurs, il n'est fait aucunement mention des procédés de préparations des solutions de HbO_2 et HbCO utilisées. Aucun d'eux ne mentionne l'obligation de centrifuger les dilutions, sous peine d'obtenir une diffusion importante de la lumière incidente par les leucocytes surtout.

Or nous avons remarqué que les solutions de Carboxyhémoglobine préparées par saturation de l'Oxyhémoglobine par le gaz d'éclairage, et insuffisamment centrifugées, étaient plus diffusantes que les solutions d'oxyhémoglobine correspondantes. Nous avons alors pensé à l'influence possible de la Diffusion dans la transmission des Infra-Rouges.

1 - Nous nous sommes assurés d'abord que cette diffusion était bien sous la dépendance du temps de centrifugation.

Une centrifugation de 15 minutes à 5000 tours est suffisante pour obtenir une solution limpide, avec les dilutions d'oxyhémoglobine ; mais avec les solutions de carboxyhémoglobine préparées avec le gaz d'éclairage, 30 minutes à 6000 tours sont nécessaires.

D'autre part les faibles variations de pH n'apportent aucune modification à cette diffusion. Plusieurs séries de solutions $\left\{ \begin{array}{l} \text{HbO}_2 \\ \text{HbCO} \end{array} \right.$, non centrifugées, tamponnées à pH divers, de 6,5 à 8, mises sur le trajet des rayons lumineux, se montrèrent aussi diffusantes les unes que les autres vis-à-vis de la lumière blanche.

2 - Préparation des solutions pures d'Oxy- et Carboxy-hémoglobines.

Pour éviter l'influence des éléments figurés (Leucocytes) et composant du plasma, nous avons préparé des solutions pures d'Oxyhémoglobine et Carboxyhémoglobine.

a) Oxyhémoglobine.

150 cc. de sang recueilli sur FNa sont centrifugés. Le plasma est séparé. Les éléments figurés sont remis en suspension dans 10 volumes environ d'une solution de ClNa à 10 p.‰ ; une centrifugation modérée pendant 20 minutes laisse en suspension les éléments figurés autres que les hématies. Après élimination du liquide trouble surnageant on ramène au poids initial avec la solution à 1 p.1000 de ClNa ; on agite ; puis on centrifuge une deuxième fois. On recommence une 3e fois. Un quatrième lavage est suivi d'une centrifugation plus rapide (3000 t.) pendant 20 minutes qui permet de concentrer la suspension d'hématies. Le liquide clair est siphonné. On mé-

lance la suspension de globules rouges à un volume égal d'eau distillée et on laisse en contact 2 heures.

On ajoute ensuite 1/4 du volume total du toluène, on émulsionne avec une baguette de verre 3 fois à 10 minutes d'intervalle puis on verse sur un filtre de papier plissé préalablement humecté avec de l'eau distillée et l'on abandonne pendant 12 heures environ à 4°C. Le liquide limpide est agité avec le 1/4 de son volume de toluène comme précédemment et filtré rapidement à travers un double filtre mouillé. Les solutions obtenues tiennent 6 à 9 milliatomes de fer par litre (CHALOPIN et Mmes COLSON-GLASTALA [18]).

Pour obtenir l'Oxyhémoglobine cristallisée on amène la solution à $\text{pH} = 7$ par un tampon aux phosphates de K, puis on sature à 20°C par du sulfate de sodium cristallisé. On filtre et on obtient la cristallisation en émulsionnant avec du toluène (1/4 du volume total). Les cristaux sont recueillis sur un filtre et conservés à 4°C.

On diluait au 1/100 l'oxyhémoglobine cristallisée avec de l'eau distillée préalablement bouillie et refroidie, à laquelle on ajoutait 1% de la solution-tampon phosphatée potasso-sodique de $\text{pH} = 7$.

b) Carboxyhémoglobine pure.

La moitié de la solution précédente était alors saturée de CO pur préparé selon le procédé indiqué plus haut.

3 - Mesures de transparence.

Les deux solutions pures, parfaitement limpides, montrèrent, dans l'Infra-Rouge, la même différence d'absorption que les solutions à taux identiques de Hb, préparés avec du sang et centrifugés 30 minutes à 6000 tours.

Les dilutions étaient versées dans une cuve à faces parallèles de 1 cm. d'épaisseur. Il était facile de faire des mélanges en quantités croissantes de HbCO et d'établir une première courbe expérimentale:

<u>Pourcentages</u>		<u>Transmission %.</u>
<u>en HbCO</u>		<u>par rapport à l'eau.</u>
(Elongation correspondant à l'eau sous 1 cm. = 155 m/m)		
Solutions à 1 %.	0 (HbO ₂ pure)	74
	10	76
	30	80
	50	84
	75	88
	100 (HbCO pure)	92

Si l'on porte en abscisses, les % de HbCO et en ordonnées les Transmission %, on obtient approximativement une droite.

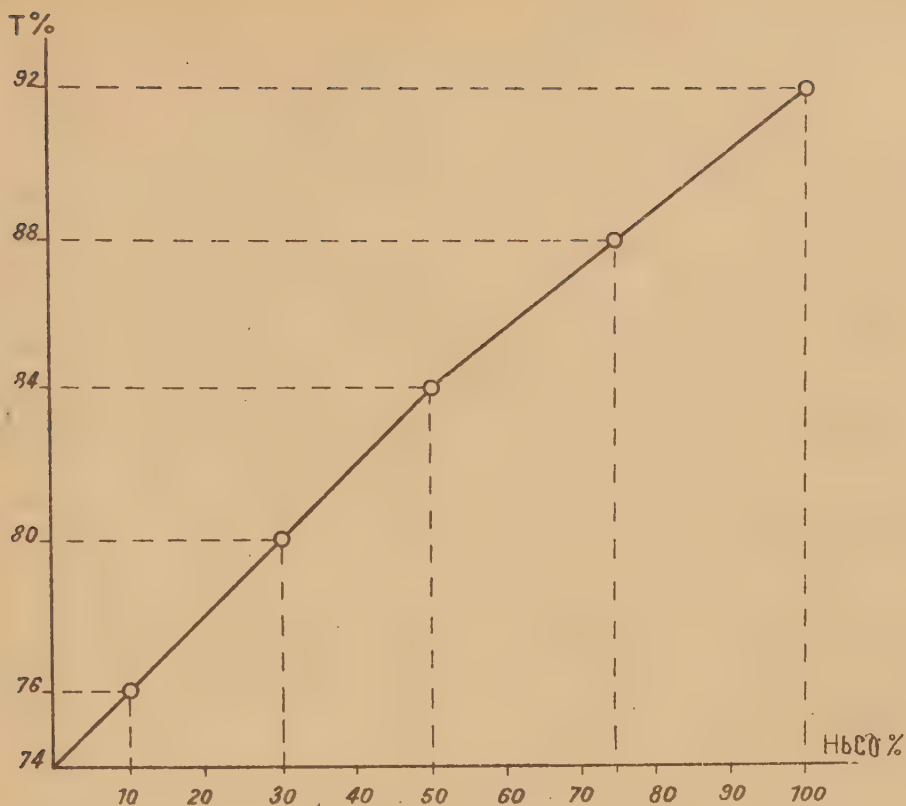


Fig.38

Il était donc ainsi vérifié, que, "in vitro" la Carboxyhémoglobine pure était transparente aux Infra-Rouges, et que, la transmission, pour les longueurs d'onde en jeu, augmentait sensiblement comme la teneur en HbCO.

Nous allons voir que les faits sont tout autres quand on s'adresse au Sang Pathologique vrai.

CHAPITRE TROISIEME

COMPLEXITE DU PHENOMENE

Si la transparence croit comme la teneur en HbCO, comment expliquer les faits décrits par DUVOIR, PELLET [27] etc... qui ont observé dans plusieurs sangs de sujets intoxiqués aigus, et longtemps après le départ de tout excès de CO dans ces sangs (15 et même 20 jours après traitement au carbogène, ces sangs pathologiques ne contenaient plus que des quantités de CO allant de 0 cc.50 à 1 cc. %.), une "transparence résiduelle importante", plus du tout en rapport avec la fraction de CO dosable ?

Nous avons effectué les expériences suivantes, cherchant à éclairer cette question :

1 - Essais de Régénération "In Vitro" du sang Oxycarboné.

Nous avons préparé selon le procédé classique, des solutions d'Oxy- et Carboxyhémoglobine, et mesuré leurs absorptions dans l'Infra-Rouge(1).

Nous avons ensuite régénéré la solution de HbCO, en faisant barboter de l'oxygène sous-pression pendant 1 h.30 min. Au cours de la régénération, nous dosions HbCO grossièrement au spectrophotomètre, et nous estimions simultanément la transparence. Nous avons observé alors une diminution de la transparence et du taux de HbCO parallèles :

<u>HbCO %.</u> <u>(dilution 1/100 sous 1 cm)</u>	<u>Transmission %.</u> <u>(par rapport à l'eau)</u>
100	92
75	87
50	83
0	74

2 - Nous avons expérimenté d'autre part plusieurs sangs pathologiques.

Il s'agissait de sujets ayant été intoxiqués de façons diverses:

a) Première Série : Sang n° I

Mme D..., 35 ans, entrée dans le service du Professeur Chevalier, à l'Hôpital Broussais, après intoxication aigue volontaire par le gaz d'éclairage et réanimation par le carbogène et l'huile éthéro-camphrée. Cinq

(1) Dans tout ce travail, nous entendons par infra-rouge la bande voisine de $\lambda = 8.350 \text{ \AA}$ (voir p. 95).

jours après l'intoxication, la malade se plaint encore de "céphalée en casque", douleurs hypogastriques et nausées ; son sang ne contient plus que 0 cc.30 % de CO (Wolff).

- Il présente aux Infra-Rouges une transparence égale à 43 % de la transparence de la Carboxyhémoglobine totale (mesurée sur dilution au 1/5° et 2 m/m d'épaisseur, par rapport à la transparence de l'eau dans les mêmes conditions).

- Régénéré par l'Oxygène pendant 30 minutes il devient entièrement opaque à l'Infra-Rouge (absorption de HbO₂ pure).

- Quinze jours après l'intoxication, un nouvel examen du sang du malade indique qu'il ne contient plus de CO en quantités dosables, et ne présente aucune transparence aux Infra-Rouges.

La malade présente cependant encore des signes de sinusite.

b) Deuxième série : Sang n° II et III.

Il s'agit de P... Paul (sang n° II) et G... André (sang n° III) travaillant dans une usine de constructions automobiles, entrés dans le service le 15-4-50, pour intoxication chronique par CO.

Le 14-4-50, des dosages effectués à l'Institut Médico-Légal indiquèrent :

Sang n° II : 1,15 cc % de CO

Sang n° III : 0,95 cc % de CO

Les malades furent soumis au carbogène pendant 2 jours. Des dosages effectués au bout de ce temps indiquaient :

Sang n° II : 0,30 % de CO

Sang n° III : < 0,30 % de CO

Examinés alors à l'Infra-Rouge les derniers échantillons présentait respectivement 98 et 94 % de la transparence de la Carboxyhémoglobine totale. Leur absorption n'était donc plus en rapport avec la teneur en CO dosable.

- Après 1 heure de régénération par O₂, ces échantillons offraient toujours la même transparence.

c) Troisième Série : Sangs n° IV, V, VI, VII.

En provenance du service du Dr Gautier de l'Hôpital St-Louis ; il s'agit dans les quatre cas de sujets intoxiqués chroniques travaillant dans des établissements industriels divers ; voici résumées dans le tableau suivant les caractéristiques observées avec ces sangs :

Sangs	Taux de CO (Nicolux)	Transparence aux I.R.
		(transmission mesurée sous 2 m/m avec dilution au 1/5e ; par rapport à l'eau élongation obtenue avec l'eau: 72 m/m.
Sang n° IV B... Amédée	0,45 cc.°/.	83 %.
Sang n° V B... Marcel	0,65 cc.°/.	83 %.
Sang n° VI G... André	1,27 cc.°/.	75 %.
Sang n° VII B... Robert	1,32 cc.°/.	65 %.

Or, à ce taux de dilution (1/5e), et mesurés sous 2 m/m ;

- la solution de HbCO 100 %/o. présente 84 %/o. de la transparence sous l'eau

- " " " HbO₂ 100 %/o. " 65 %/o. " " "

De plus les 3 premiers sangs (IV, V et VI) régénérés pendant 45 minutes par O₂, ne présentent aucune modification, au rayonnement I.R.

- Avec les sangs IV et V on a donc une transparence quasi totale ; avec le sang VI une transparence partielle et avec le sang VII aucune transparence.

De plus, la transmission n'est aucunement proportionnelle à la quantité de CO dosable.

En résumé, que peut-on conclure à la suite de ces expériences ?

Nous sommes certains que la Carboxyhémoglobine préparée "in vitro" présente une nette différence d'absorption avec l'Oxyhémoglobine ; nous avons vu que dans ce cas la transmission semble être fonction linéaire du pourcentage en HbCO.

Mais en réalité, ce phénomène est accompagné d'un tout autre processus :

- Dans les intoxications chroniques, la transparence n'est plus simplement proportionnelle à la teneur en HbCO, comme le laissaient entendre DUVOIR et TRUFFERT [25] [28] [94]

- Dans aucun cas, de sang intoxiqué chronique, nous n'avons pu, en régénérant le sang par oxygénation, retrouver l'absorption de HbO₂ pure, alors qu'avec le sang n° I, d'intoxiqué aigu, la transparence a disparu totalement après régénération, exactement comme avec la Carboxyhémoglobine préparée "in vitro".

Il aurait été très intéressant de suivre pendant un certain temps les malades présentant les anomalies précitées et de rechercher par exemple un rapport possible entre cette anomalie persistante et un fonctionnement anormal de certains organes, tels le foie, la rate etc... Malheureusement, nous n'avons pas pu examiner à nouveau ces patients.

3 - Conclusion.

Ces quelques expériences ne sont évidemment pas suffisantes pour permettre l'élaboration d'une théorie. Toutefois, nous sommes en mesure de faire une distinction très nette entre :

- l'Intoxication aiguë, où le phénomène de transparence résiduelle ne serait que passager et disparaîtrait grosso-modo en même temps que l'excès de CO sanguin ; la régénération par O₂ aboutissant aux mêmes effets.

- Et l'Intoxication Chronique où l'"Oxycarbonisme" et la "Transparence" aux Infra-Rouges seraient deux phénomènes totalement dissociés. On pourrait même, dans ce cas, attribuer cette propriété physique à une autre cause qu'à l'"Oxycarbonisme" classique ; étant donné que la régénération "in vitro" ne modifie en rien les propriétés physiques du sang dans ce cas.

Cette hypothèse nous conduit à soupçonner la présence, chez les sujets intoxiqués chroniques, d'un autre composé X..., responsable du phénomène. Une longue série de recherches s'imposerait ici.

On pourrait également songer à une intervention des substances résultant de l'action de CO sur les composés voisins de l'hémoglobine, dont nous avons parlé dans la première partie de cette thèse. C'est pourquoi nous disions plus haut que des examens de la fonction hépatique des sujets pourraient peut-être apporter quelque lumière.

En tous les cas, nous ne pensons pas, dans l'état actuel des choses, que l'on puisse établir une méthode quantitative directe d'estimation de HbCO basée sur l'absorption infra-rouge.

C O N C L U S I O N

En résumé :

1 - Dans la première partie de ce travail, nous avons résumé brièvement les propriétés intéressantes de CO et de son composé hémoglobinique en rapport direct avec les méthodes de dosages de ce gaz dans le sang.

2 - Nous avons ensuite fait l'étude critique des principales méthodes, physiques, chimiques, admises jusqu'à ce jour, en tenant compte de leurs avantages et inconvénients respectifs.

3 - Dans la troisième partie, nous avons proposé notre méthode microphotométrique. Nous avons vu quels avantages procuraient l'établissement expérimental de la courbe-étalon, quelles précautions il y avait lieu de prendre dans la préparation des dilutions sanguines, nous avons fait remarquer l'influence du pH sur la spectrographie des solutions diluées de HbO₂ et HbCO.

La méthode étant mise au point, nous avons décrit la technique de dosage dans le détail et rapporté quelques résultats obtenus.

Si la méthode ne peut être appliquée au dosage des très faibles quantités de CO (jusqu'à 0,0075 %) avec précision, nous pensons que pour toutes les valeurs supérieures, elle offre de l'intérêt, même dans le cas de nombreuses intoxications chroniques.

4 - Nous avons effectué une série de dosages comparés par notre méthode par la microméthode de Wolff et par la méthode de Nicloux.

5 - Enfin nous avons abordé l'étude de la Spectrographie Infra-Rouge des composés oxygénés et oxycarbonés de l'hémoglobine ; si l'on doit abandonner tout espoir d'évaluer quantitativement CO par ce procédé, on est par contre amené à dissocier de plus en plus l'Intoxication Aigue et l'Intoxication Chronique, aussi bien dans leurs effets que dans leurs causes.

L'infra-rouge fournit un test d'intoxication oxycarbonée chronique, indépendamment du dosage du CO. Le problème est désormais posé de savoir quel est le véritable responsable des propriétés physiques particulières du sang d'intoxiqué oxycarbonique chronique.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- 1 - ASTAPENYA, VAPNIK et ZELKIN -
L'effet de la surface de l'agent oxydant sur le taux
d'oxydation de CO.
J.Gen.Chem. (U.S.S.R.), 1933, 3, 839-42.
- 2 - BALTHAZARD (V.) -
Détermination spectrométrique du coefficient d'empoisonnement
dans l'intoxication oxycarbonique.
Bull.Soc.Chimie Biol., 1924, 6, 817-824.
- 3 - BALTHAZARD (V.) -
Inocuité des faibles doses de CO.
Précis de Médecine Légale, 1921, 145-148
- 4 - BARKAN (G.) -
Le complexe CO-Pseudohémoglobine.
Deutsch. Med. Woch., 1938, 64, 638
- 5 - BARKAN et SCHALES -
Pseudo-hémoglobine.
Z. Physiol.Chem. 1938, 83, 253.
- 6 - BARTHE-PARIS-DELSOL -
Dosage de CO dans le sang des travailleurs exposés à l'inhalation
de faibles quantités de ce gaz.
Arch.Mal.Profession. 1947, 8, n°3, 274-279.
- 7 - BARTHE-PARIS-DUCHEMIN et THOMAS -
Etude comparée des résultats obtenus par les méthodes eudiomé-
triques et d'absorption par Cl₂Cu₂ pour le dosage de CO du sang.
Arch.Mal.Profession. 1949, 10, 581.
- 8 - BERNARD (Cl.) -
Leçon sur l'Asphyxie - Paris 1875.
- 9 - BERNARD (Claude) -
Taux limite de la teneur en CO de l'air pour la réaction
spectroscopique.
"Leçons sur les effets des substances toxiques et médica-
menteuses" - Paris-Baillière 1857.
- 10 - BERROD cité d'après RAYMOND et VALLAUD -
"L'Oxyde de Carbone et l'Oxycarbonisme" Paris 1950, p.267.
- 11 - BEZNAK (M.) -
L'absorption des composés de l'hémoglobine et de la Myoglobine
dans la région de Soret.
Acta Chemica Scandinavica 1948, 2, 342.

- 12 - BLAND (E.) -
Microméthode pour le dosage de CO dans le sang.
Australian J.Exptl.Biol.Med.Sci. 1940, 18, 34-37.
- 13 - BOURGUIGNON (G.), BENOIST (F.) et BOURGUIGNON (A.) -
Tests objectifs fournis par les examens électriques dans l'intoxication professionnelle chronique dite oxycarbonée.
La semaine des Hôpitaux 1950, n°76, 3990-94.
- 14 - BURESCH (H.) -
Méthode pour le dosage de CO dans le sang.
Arch.Gewerbepath.Gewerbehg. 1934, 5, 210-28.
- 15 - BURESCH (H.) -
Erreurs expérimentales dans la méthode de Nicloux pour le dosage de CO.
Deut. Z. Ger. Gericht. Med. 1934, 23, 309-13.
- 16 - CAMUS et PAGNEZ -
Fixation de CO sur l'hémoglobine du muscle.
Compt.Rend.Soc.Biol. 1903, 257, 837.
- 17 - CAVIGNEAUX et CHARLES -
L'Oxycarbonémie chronique des Silicotiques.
Arch.Mal.Prof. 1949, 10, 509.
- 18 - CHALOPIN et COLSON-GUASTALA -
Evolution du spectre d'absorption de la Méthémoglobine humaine en solution tamponnée avec ou sans urée.
Bull.Soc.Ch.Biol. 31, 3-4, p.669.
- 19 - CHAMBON (M.) -
Micro-dosage palladométrique de l'Oxyde de Carbone du sang.
Annales de Biol.Clinique 1950, n° 4, 520-522.
- 20 - CHRISTMAN et RANDALL -
Une méthode commode et exacte pour la détermination de CO dans le sang.
J. Biol. Chem. 1933, 102, 595-609.
- 21 - DETTEL (M.) -
Technique photométrique de dosage de CO.
Gas Analyse, Stuttgart Eucke, 1941, p.112.
- 22 - DE SAINT-MARTIN -
Taux limite de CO dans l'atmosphère pour la réaction spectroscopique.
C.R. Ac. Sciences, 1898, 126, 1036-37.
- 23 - DOGNON (A.) -
Un procédé simple de dosage optique, sans emploi d'étalons colorés.
C.R. Soc.Biol. 1938, 129, 467.
- 24 - DOGNON (A.) -
Méthode optique simple de dosage de l'hémoglobine sans étalon coloré.
C.R. Soc.Biologie 1938, 129, 469.

25 - DUVOIR -

La transparence du sang oxycarboné aux radiations infra-rouges.
Bull. et Mem. de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris
1939, p.747.

26 - DUVOIR-DEROBERT et TRUFFERT.

Recherches sur l'Oxycarbonisme chronique.
Recueil des travaux de l'Institut National d'Hygiène
1946, 2, 561.

27 - DUVOIR - PELLET - THIENEBAULT -

Intoxication oxycarbonée aigue avec lésions cutanées, syndrome
néphritique et transparence persistante aux Infra-Rouges.
Bull. et Mem. de la Soc. Méd. des Hôp. de Paris, 1939.

28 - DUVOIR et TRUFFERT -

Détermination de l'oxycarbonémie et sa signification.
Arch. Mal. Profession. 1943, 5, 80-88.

29 - EGGERT -

Recherches sur l'action de CO sur le sang à l'aide de la
photographie Infra-Rouge.
Public. du Lab. Scient. des Services Photograph. Agfa
1935, 4, 110-113.

30 - FABRE (R.) -

Leçons de Toxicologie T.III.
Toxicologie des gaz, 1943, p.48.

31 - FABRE (R.) -

Leçons de Toxicologie T.III.
Toxicologie des gaz, 1943, p.51

32 - FLORENTIN (D.) -

Contribution à l'étude de l'oxycarbonémie chez les fumeurs.
Arch. Mal. Prof. 1949, 10, 38.

33 - FREDERICK -

Intoxication par CO.
Analyst 1931, 56, 561-72.

34 - FROHLICH (A.) et RODENACKER -

Etude de la photographie infra-rouge du sang.
Munch. Med. Wschr. 1935, 82, 146-7.

35 - GIGON (A.) et NOVERRAZ (M.) -

Une méthode simple et sensible d'analyse de CO dans le sang.
Schweizerische Med. Woch. 1937, 67, 454.

36 - GRAY et MARJORIE SANDIFORD -

Méthode à micro-diffusion pour l'estimation de CO dans le sang.
Analyst, 1946, 71, 107-110.

37 - GREHANT -

"Les Poisons de l'air" Paris-Baillière 1890.

- 38 - GREHANT -
Mode d'élimination de CO après un empoisonnement partiel
produit par ce gaz.
C.R. Soc. Biol. 1872, 24, 228.
- 39 - GRUT, cité d'après SIMONIN -
Dosage colorimétrique de CO dans le sang.
"Médecine du Travail". Maloine - Paris 1950.
- 40 - GUILLOT (M.) et RENAULT (H.) -
Importance de la nature de la source lumineuse utilisée dans
la méthode de dosage de l'hémoglobine, selon Dognon.
"Le Sang" 1944, 16, 255-58.
- 41 - GUILLOT (M.) et RENAULT (H.) -
Sur le dosage de l'hémoglobine dans le sang par la
technique de Dognon.
"Le Sang" 1944, 16, 243-246.
- 42 - HALDANE -
Action de CO sur l'homme.
J. Physiol. 1895, 18, 430.
- 43 - HARTRIDGE (H.) -
A spectroscopic method of estimating carbon monoxide.
Journ. of Physiol. 1912, 44, 1-21.
- 44 - HARTRIDGE (H.) -
Proc. Physiol. Soc. J. Physiol. 1921, 54, 138.
- 45 - HERMANNSEN et KNIPPING -
Détermination de CO dans le sang.
Z. Physiol. Chem. 1932, 206, 168-76.
- 46 - HOPPE - SEYLER - SALKOWSKY cité d'après RAYMOND et VALLAUD -
"L'Oxyde de Carbone et l'Oxycarbonisme" Paris 1950, p.255-57.
- 47 - HORECKER et BRACKETT -
Une méthode spectrophotométrique rapide pour le dosage de la
Méthémoglobine et de la Carboxyhémoglobine dans le sang.
J. Bioch. Chim. et Clinique 1944, p.156.
- 48 - KILLICK (E.M.) -
Physiol. Rev. 1940, 20, 313.
- 49 - KIPP et ZONNEN -
"Microphotomètre enregistreur Moll".
Catalogue No - K 40 (Delft-Hollande).
- 50 - KOHN-ABREST -
"Précis de Toxicologie" 1948,
G. Doin et Cie: éditeurs, Paris.
- 51 - KOHN-ABREST -
Recherches sur l'Oxycarbonémie - Nouvelle technique.
Arch. Mal. Professionn. 1947, 8, 51-54

52 - KOMATU HUMIO -

La Méthode à l'acide pyrotannique pour la détermination de CO dans le sang.

J. Oriental.Med. 1939, 30, 775-83.

53 - KRAULAND (W.) -

Test au pyrogallol pour la mise en évidence de CO dans le sang.

Zeut. Gewerbe. Ungallverhut 1941, 28, 128.

54 - LAWRENCE -

Les Isotopes en Recherche.

J.A.M. 1947, vol. 134, 221-22.

55 - LEHMANN cité d'après RAYMOND et VALLAUD -

"L'Oxyde de Carbone et l'Oxycarbonisme"

Paris 1950, p.255-257.

56 - LEMBERG (R.) -

Reduction of biliverdin in bilirubin in tissus.

Biochem. Journ. 1936, 30, 1147.

57 - LIEBECQ -

Propriétés spectrophotométriques de la pseudo-hémoglobine de Barkan.

Acta intern.Physiol 1943, 53, 103.

58 - LIEBMAN cité d'après RAYMOND et VALLAUD -

"L'Oxyde de Carbone et l'Oxycarbonisme" Paris 1950, p.255-57.

59 - LOEPFER -

L'oxycarbonémie endogène.

La Presse Médicale 1939, n° 95-96, 1649-50.

60 - LOEPFER et TONNET -

CO dans le sang et les tissus dans l'intoxication oxycarbonée aigue.

Bull.Mem. Soc.Med.Hop.Paris, 1939, 55, 312.

61 - LOTHIAN -

"Absorption Spectrophotometry"

London 1949, 101-103.

62 - MAY (J.) -

Eine methode zur schnellen und geeranten messung sehr kleiner mengen von COHb im Blut.

Arch. Gewerbepath. 1937, 8, 21-25.

63 - MERKELBACH (O.) -

Die Biologische bedeutung der Infraroten strahlen.

Helvetica Medica Acta Suppl.I, 1937, p.37.

64 - MOSSO -

Effets de CO sur l'homme.

Arc. Ital. Biol. 1901, 35, 1.

- 65 - NEWCOMER (H.S.) -
Coefficients d'absorption de OxHb. et CarboxyHb.
J. Biol. Chem. 1919, 32, 415.
- 66 - NICLOUX -
"L'Oxyde de Carbone et l'intoxication Oxycarbonique"
Paris, Masson 1925.
Préparation de CO pur, p.154-5.
- 67 - NICLOUX -
" Spectrographie et Spectrophotométrie
p. 208.
- 68 - NICLOUX -
" Propriétés biologiques de CO
p.56-57 et suivantes.
- 69 - NICLOUX -
" Dosage de CO dans le sang, p. 197.
- 70 - NICLOUX -
" Coefficient d'empoisonnement, p.206.
- 71 - NICLOUX -
Sur l'Oxyde de Carbone contenu normalement dans le sang.
C.R. Ac. Sciences 1926, 126, 1898.
- 72 - NICLOUX -
Sur la présence de CO dans le sang du nouveau-né.
C.R. Ac. Sciences 1901, 132, 1501.
- 73 - NICLOUX et BALTHAZARD.-
Coefficients d'empoisonnement dans l'intoxication mortelle
oxycarbonique chez l'homme.
C.R. Ac. Sciences 1925, 152, 1787.
- 74 - NICLOUX - GELMA et SIMONIN -
Modifications à l'appareil de Nicloux pour l'extraction de CO.
C.R. Soc. Biol. 1926, 95, 1603-1606.
- 75 - NORBERG (B.) -
Détermination de CO dans le sang.
Acta Medica Scand. 1942, 112, 2-6.
- 76 - OGIER et KOHN-ABREST -
"Chimie Toxicologique", 1924, p.63-86-88.
- 77 - PARNAS et SIENAWSKI -
Eine photometrische Methode zur bestimmung des Kohlenoxyds im Blut
Biochem. Zeits. 1933, 266, 102-106.
- 78 - PASCAL -
Traité de Chimie Minérale -
Paris, Masson 1931, 2, 118-147.

- 79 - PAULING -
Nature of the Chemical bond.
Cornell University Press, 1945, paragraphe 16.
- 80 - FERELLI -
La determinazione quantitativa dell'ossido di carbonio nel sangue
per mezzo della fotografia all'infra-rosso.
Diaf.-c-tecn.-di laboratorio 1938, 2, 407-12.
- 81 - PIERRET -
L'Asphyxie par CO.
"La Santé de l'Homme" 1949, n°55, Juillet-Août.
- 82 - PIETERS et HANSSEN -
Détermination du degré de saturation oxygéné du sang à l'aide
du photomètre de Leifo.
Rec. Trav.Chim. Pays-Bas. 1948, 67, 782-794.
- 83 - PILAAR (W.M.) -
Détermination de CO dans le sang.
Chem. Weekblad 1928, 25, 509-13.
- 84 - RANKE et SEYDEL -
Dosage spectrophotométrique de CO dans le sang.
Veroff Heeressan Wes. 1939, 108, 200-210.
- 85 - RAYMOND (V.) et VALLAUD (A.) -
"L'Oxyde de Carbone et l'Oxycarbonisme"
Publié par l'Institut National de Sécurité pour la Prévention
des Accidents du Travail et des Mal.Prof. Paris, 1950.
- 86 - RIECKE (M.) -
Über den nachweis, von CO im Blute mit der Infrarot photographia
Thèse 1936, Gottingen.
- 87 - ROUGHTON (J.W.) et ROOT (W.S.) -
The fate of CO in the Body during recovery from carbon monoxyd
poisoning in man.
American Journ. of Physiol. 145, 1945, p. 239-252.
- 88 - ROUGHTON, ROOT, TOBIAS et LAWRENCE -
Am. J. Physiol. 1945, 145, 253.
- 89 - SAIAS et CHEVREAU -
Une burette à gaz pour le dosage de l'oxycarbonémie
par la méthode de Kohn-Abrest.
Ann. Biol. Chimiq. 1948, 6, n° 314.
- 90 - SAYERS (R.R.) -
"The pyrotannic acid Method for the Quantitative determination
of carbonoxide in blood and air."
- 91 - SCHMIDT -
Apparition de la bande de Stokes.
Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 1939, 19, p.6.

- 92 - SCHMIDT -
Dosage gazométrique de faibles quantités de CO dans le sang.
Z. Klin.Med. 1939, 136, 151-66.
- 93 - SCHOLTEN (C.) -
Détection de CO dans le sang.
Deut.Z.Ges.Gerichtl.Med. 1939, 30, 292-96.
- 94 - TRUFFERT -
"La transparence du sang oxycarboné aux Infra-Rouges."
Bull.Soc.Méd.Hop. 1939, 55, 745-747.
- 95 - WEINBACH (A.) -
Infrared photography of hemoglobin compounds.
Z.Ges.Exptl.Med. 1937, 101, 477-83.
- 96 - WELZEL cité d'après RAYMOND et VALLAUD -
"L'Oxyde de Carbone et l'Oxycarbonisme".
p.255-57, Paris, 1950.
- 97 - WENNESLAND (R.) -
Une nouvelle méthode pour le dosage de CO dans le sang.
Acta Physiol.Scand. 1940, 1, 49-70.
- 98 - WOLFF (E.) -
Une méthode très simple pour la détermination de petites
quantités de CO dans le sang.
Annal. Méd. Lég. 1947, n°6, 221.
- 99 - ZALESKI - Cité d'après RAYMOND et VALLAUD -
"L'Oxyde de Carbone et l'Oxycarbonisme".
Paris 1950, p.255-257.
-

Paris, le 5 Octobre 1951
Vu, le Doyen de la Faculté de
Pharmacie

R. FABRE

VU et permis d'imprimer
LE RECTEUR de l'Académie
de PARIS

Le Vice-Président du Conseil de
l'Université de Paris:

Signé: DUPONT

